



**SUBSTÂNCIAS PSICOATIVAS PRESENTES NAS *LEGAL HIGHS*
ADQUIRIDAS NAS SMARTSHOPS OU PELA INTERNET:
CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E ESTUDO DA CITOTOXICIDADE
IN VITRO DO *KRATOM* (*Mitragyna speciosa*)**

Ana Sofia da Silva Oliveira

Mestre em Toxicologia Analítica Clínica e Forense

Dissertação do 2º ciclo de Estudos Conducente ao grau de Mestre em Toxicologia
Analítica Clínica e Forense na Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto

Laboratório de Toxicologia do Departamento de Ciências Biológicas,

Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto

Trabalho realizado sob a orientação da Doutora Maria Paula Amaral Alegria Guedes de
Pinho e coorientação da Doutora Sónia Alexandra Teixeira Fraga, do Professor Doutor
Félix Dias Carvalho e da Professora Doutora Maria de Lourdes Pinho de Almeida
Souteiro Bastos

Universidade do Porto

Setembro, 2014

É AUTORIZADA A REPRODUÇÃO INTEGRAL DESTA DISSERTAÇÃO APENAS PARA EFEITOS DE INVESTIGAÇÃO, MEDIANTE DECLARAÇÃO ESCRITA DO INTERESSADO, QUE A TAL SE COMPROMETE.

Agradecimentos

Em primeiro lugar, presto o meu agradecimento a todas as pessoas que de alguma forma tornaram este projeto possível, assim como à Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto, ao Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge e à Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa.

À Professora Doutora Maria de Lourdes Bastos, ao Professor Doutor Félix Carvalho, à Doutora Paula Guedes e à Doutora Sónia Fraga, agradeço a colaboração com a ajuda, o entusiasmo, a dedicação e também a motivação que demonstraram durante todo o trabalho desenvolvido.

Ao Laboratório de Toxicologia, do Departamento de Ciências Biológicas da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto, agradeço o suporte financeiro imprescindível para que este estudo fosse realizado, assim como todo o equipamento disponibilizado.

Ao Professor Doutor João Paulo Teixeira, Diretor da Unidade do Ar e Saúde Ocupacional do Departamento de Saúde Ambiental no Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, agradeço a oportunidade de realizar o estudo genotóxico no seu centro de investigação, permitindo que fossem reunidas todas as condições necessárias para que o trabalho corresse da melhor forma.

À Doutora Cristiana Costa Pereira e à Doutora Carla Costa, do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, agradeço a disponibilidade e a paciência para me ajudarem sempre que precisei, como também agradeço o incentivo e motivação que sempre me transmitiram.

À Doutora Helena Gaspar, do Departamento de Química da Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa, agradeço o envio de algumas das amostras de *Kratom* analisadas.

A todos os membros do Laboratório de Toxicologia, agradeço a simpatia e suporte transmitido durante este ano, especialmente à Engenheira Maria Elisa Soares, ao Daniel Barbosa e à Rita Azevedo.

Às minhas colegas de laboratório e amigas Armanda Gomes, Mariana Fernandes, Débora Oliveira, Filipa Ferreira, Márcia Monteiro e Margarida Araújo, agradeço a amizade, o carinho e o sobretudo o apoio incondicional ao longo deste ano.

Finalmente, agradeço aos meus pais e ao meu Ivo que sempre me motivaram, acarinharam e apoiaram em todos os momentos para que este projeto fosse concretizado até ao final. Obrigada, sem vocês não teria sido possível!

O mercado recreativo das drogas tem vindo a sofrer algumas mudanças nos últimos anos. As novas substâncias psicoativas, intituladas de “drogas legais”, vendidas nas *smartshops* ou pela Internet, têm vindo a estabelecer-se rapidamente neste mercado, principalmente entre os jovens. Estas drogas têm alarmado as autoridades competentes devido à inexistência de informação sobre a sua composição real, como também à falta de avaliação dos seus riscos para a saúde. Por estas razões, existe à volta destas drogas, uma grande preocupação pela falta de segurança que apresentam para os consumidores. Nos últimos anos, a *legal high* mais procurada na Internet, como também uma das mais populares em todo o mundo entre os jovens, é o *Kratom* – uma droga extraída da planta *Mitragyna speciosa*, constituída principalmente por alcalóides. O *Kratom* provoca efeitos estimulantes e sedativos, dependendo da dose consumida, sendo também procurado pelos consumidores de opióides para o tratamento dos sintomas de abstinência.

No presente estudo, a caracterização química por cromatografia gasosa com espectrometria de massa de várias amostras comerciais de *Kratom* teve o intuito de desvendar a composição real destas amostras vendidas nas *smartshops* e pela Internet, identificando e quantificando as principais substâncias psicoativas presentes na sua composição - mitraginina, 7-hidroxitmitraginina, painanteína, especioiginina, especiociliatina e corinoxina A/B. A extração de uma pequena porção de amostra (50 mg) com uma mistura de clorofórmio:metanol (1:2) com ultrassonização mostrou-se eficiente para esta análise. A aplicação deste método desenvolvido aos extratos de amostras comerciais de *Kratom* mostrou uma discrepância entre a informação fornecida aos consumidores acerca da “potência” e da “dose a consumir” e a composição real destas amostras.

Este trabalho teve também como objetivo a avaliação da citotoxicidade provocada pelos constituintes químicos nos extratos destas amostras, após 6 e 24 horas de exposição, nos modelos *in vitro* intestinal (Caco-2) e neuronal (SH-SY5Y). O padrão de mitraginina, na gama de concentrações 0 – 60 µg/mL, foi usado como composto de referência para comparação de efeitos citotóxicos, sendo observado uma diminuição da viabilidade celular dependente da concentração. As células SH-SY5Y mostraram ser as mais sensíveis aos extratos das amostras testadas. Os extratos das amostras de resina e de “extratos em pó” revelaram ser as mais citotóxicas para ambas as linhas celulares com os valores de IC₅₀ inferiores às amostras de folhas e à mitraginina. Por este motivo,

estas amostras, juntamente com o padrão de mitraginina, foram escolhidos para um estudo de genotoxicidade nas células intestinais Caco-2, após 24 horas de exposição. O dano significativo no DNA foi observado em todas as amostras testadas, exceto no padrão de mitraginina, o que indica que outros componentes existentes nos produtos comerciais, para além deste alcalóide, são os responsáveis pelo dano no DNA. Outra das causas para esta toxicidade dos extratos, em relação à mitraginina padrão, pode estar também relacionada com a presença da mistura de alcalóides no extrato, podendo esta potenciar os seus efeitos de um modo aditivo ou sinérgico. O extrato de amostra de resina de *Kratom* e de *Kratom Gold Extract* foram as que provocaram uma maior genotoxicidade no modelo celular estudado.

Desta forma, os resultados apresentados neste estudo são fundamentais para que sejam percebidos os riscos que estas drogas psicoativas representam para a saúde, como também para consciencializar os consumidores do perigo destas substâncias, podendo vir a ajudar a promover uma mudança de comportamentos nos jovens de todo o mundo.

Palavras-chave: NPS, Drogas Legais, *Kratom*, *Mitragyna speciosa*, Mitraginina, GC-MS, Citotoxicidade, Genotoxicidade, Linha celular Caco-2, Linha celular SH-SY5Y

The recreational drug market has been suffering some changes since the last few years. New psychoactive substances, untitled the "legal highs", sold in smart shops or in the Internet, have been quickly establish in this market, especially among young people. These uses of these drugs have alerted the authorities due to absence of information on the real composition, but also to the lack of evaluation of their health risks. For these reasons, there is a major concern for the lack of consumer safety. In recent years, the legal high most popular on the Internet, as well as one of the most popular worldwide among young people, is the *Kratom* – a product extracted from the *Mitragyna speciosa* plant, containing mainly alkaloids, namely mitragynine. *Kratom* causes stimulant and sedative effects, depending on the dose consumed. It is sought for recreational use and for self-treatment of withdrawal symptoms from opioid consumers.

In the present study, a chemical characterization by gas chromatography with mass spectrometry of several commercial samples of *Kratom* aimed to determine the real composition of these samples sold in smartshops and in the Internet. This analysis allows identification and quantification of the major psychoactive substances in their composition - mitragynine, 7-hydroximitragynine, paynantheine, speciogynine, speciociliatine and corynoxine A/B. The extraction of a small portion of sample (50 mg) with a mixture of chloroform: methanol (1: 2) by ultrasonication was efficient for this analysis. The application of the developed method to several commercial products shows an inconsistency between the information provided to consumers about the "power" and "dose to consume" and the real composition of these samples.

Another objective of this study was to evaluate the cytotoxicity caused by these samples extracts after 6 and 24 hours of exposure in intestinal (Caco-2) and neuronal (SH-SY5Y) *in vitro* models. The mitragynine, in the concentration range of 0 - 60 µg/mL, was used as reference compound for comparison of the cytotoxic effects. It was observed a concentration-dependent decrease of cell viability and integrity of the lysosomal membrane. SH-SY5Y cells were shown to be the more sensitive to the tested products than Caco-2 cells. Samples extracts of Resin and extracts of "powdered extracts" proved to be the most cytotoxic to both cell lines with IC₅₀ values lower than the leaf samples and pure mitragynine. Therefore, these samples extracts along with the mitragynine were selected for a genotoxicity study in intestinal Caco-2 cells following 24 hours of exposure. A significant DNA damage was observed in cells exposed to all samples extracts tested, except to mitragynine. Another reason for this toxicity of the extracts, related to standard

mitragynine, may also be related to the presence of the mixture of alkaloids extract, which may potentiate their effect in an additive or synergistic manner. The resin sample of *Kratom* and the *Kratom Gold Extract* caused a higher genotoxicity in the studied cellular model.

Thus, the results presented in this study are fundamental to understand the risks of these psychoactive drugs for health, as well as to raise consumer awareness of the substance's dangers and promote behavior change among young people around the world.

Keywords: NPS, Legal highs, *Kratom*, *Mitragyna speciosa*, Mitragynine, GC-MS, Cytotoxicity, Genotoxicity, Caco-2 cell line, SH-SY5Y cell line

Índice

Agradecimentos	II
Resumo	V
Abstract	VII
Lista de Abreviaturas	XIII
Lista de Figuras	XVII
Lista de Tabelas	XXIII
Parte I	1
Introdução	1
1. Nova tendência no mercado das drogas: emergência de Novas Substâncias Psicoativas (NPS)	2
2. <i>Mitragyna speciosa</i> (Kratom)	5
2.1. Origem Botânica	6
2.2. Prevalência, Controle e Legislação	8
2.3. Fitoquímica	10
2.3.1. Mitraginina	12
2.3.2. 7-Hidroximitraginina	13
2.3.3. Painanteína, Especioginina e Especiociliatina	14
2.3.4. Corinoxina A e Corinoxina B	15
2.3.5. Técnicas Analíticas	16
2.4. Farmacocinética	22
2.4.1. Absorção	23
2.4.2. Distribuição	23
2.4.3. Metabolismo	23
2.4.4. Excreção	26
2.5. Efeitos Fisiológicos	27
2.5.1. Efeitos Antinociceptivos	27
2.5.2. Efeitos Neurofisiológicos	30
2.5.3. Efeitos Anti-inflamatórios	31
2.5.4. Efeitos Gastrointestinais	31
2.5.5. Outros Efeitos Fisiológicos	32
2.6. Toxicologia	33
2.6.1. Estudos <i>in vivo</i>	33
2.6.1.1. Casos de Estudo em Humanos	33
2.6.1.2. Estudos em animais	36

2.6.2. Estudos <i>in vitro</i>	37
Parte II	39
Objetivos e Âmbito da Dissertação	39
Parte III	41
Material e Métodos	41
1. Amostras Comerciais de <i>Kratom</i> e Padrão de Mitraginina	42
2. Caracterização Química de Amostras Comerciais de <i>Kratom</i> por GC-MS	45
2.1. Reagentes	45
2.2. Preparação das Soluções Padrão	45
2.3. Extração da Mitraginina e Análogos das Amostras Comerciais de <i>Kratom</i>	45
2.4. Equipamento e Condições Cromatográficas	47
2.5. Validação do Método	47
2.5.1. Linearidade	48
2.5.2. Sensibilidade	48
2.5.3. Precisão	48
2.5.3.1. Precisão Intra-day	49
2.5.3.2. Precisão Inter-day	49
3. Estudo da Citotoxicidade do Padrão de Mitraginina e de Extratos de Amostras Comerciais de <i>Kratom</i> nas linhas celulares Caco-2 e SH-SY5Y	50
3.1. Cultura Celular	50
3.2. Preparação das soluções do padrão de Mitraginina e dos extratos das amostras comerciais de <i>Kratom</i>	50
3.3. Ensaio de Citotoxicidade	52
3.3.1. Atividade metabólica - Ensaio de Redução do Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT)	52
3.3.2. Integridade da Membrana Lisossomal – Ensaio de Captação do Vermelho Neutro (NR)	53
3.3.3. Dano no DNA – Ensaio Cometa	54
3.3.4. Análise Estatística	56
Parte IV	59
Resultados	59
1. Caracterização Química de Amostras Comerciais de <i>Kratom</i> por GC-MS	60
1.1. Otimização da Extração	60
1.2. Identificação da Mitraginina e Análogos nos Extratos de Amostras Comerciais de <i>Kratom</i>	63
1.2.1. Detecção da Mitraginina	65
1.2.2. Detecção da 7-hidroxitmitraginina	67

1.2.3.	Deteção da Painanteína	68
1.2.4.	Deteção da Especiociliatina e da Especioginina	69
1.2.5.	Deteção da Corinoxina A/B	71
1.3.	Seleção e Estabilidade do Padrão Interno	72
1.4.	Validação do Método	73
1.4.1.	Linearidade	73
1.4.2.	Sensibilidade	74
1.4.3.	Precisão	74
1.5.	Quantificação da Mitraginina e Análogos nos Extratos das Amostras Comerciais de <i>Kratom</i>	75
2.	Citotoxicidade do Padrão Mitraginina e de Extratos de Amostras Comerciais de <i>Kratom</i> nas linhas celulares Caco-2 e SH-SY5Y	80
2.1.	Análise Morfológica por Microscopia de Contraste de Fase	80
2.2.	Efeitos Citotóxicos	83
2.2.1.	Determinação do IC ₅₀	83
2.3.	Genotoxicidade	93
Parte V	97
Discussão	97
Parte VI	107
Conclusão	107
Parte VII	111
Referências	111

Lista de Abreviaturas

% CV – Coeficiente de variação em percentagem

μ - Recetores opióides *mu*

κ – Recetores opióides *kapa*

δ – Recetores opióides *delta*

λ_z – Constante de eliminação

4-MEC – Catinona

5-IAI – Aminoindano

6-APB – Benzofurano

7-OHMG – 7-hidroximitraginina

AcOEt – Acetato de etilo

ALT – Alanina Transaminase

ASL – Argininosuccinato

AUC – Área sobre a curva

BHE – Barreira hemato-encefálica

BSTFA – N,O-bis(trimetilsilil)trifluoroacetamina

cAMP – Adenosina monofosfato cíclico

CB1 – Recetores canabinóides do tipo 1

CCK – Colecistoquinina

CHCl_3 – Clorofórmio

$C_{\text{máx}}$ – Concentração máxima

CORY A – Corinoxina A

CORY B – Corinoxina B

CREB – Proteína da ligação ao elemento-resposta cAMP

CYP450 – Citocromo P450

DAD – Detetor de arranjo de díodos

DMAA – Dimetilamilamina

DMEM – Meio essencial de Eagle modificado por Dulbecco

DMF – Dimetilformamida

DMSO – Dimetilsulfóxido

DP – Desvio-padrão

EC₅₀ – Concentração eficaz

EMA – Agência Europeia do Medicamento

EMCDDA – *European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction*

ESI – Sistema de ionização por *eletrospray*

ESPC – Especiociliatina

ESPG – Especioginina

EtOH – Etanol 96%

FBS – Soro fetal de bovino

FID – Detetor de ionização de chama

GC – Cromatografia gasosa

HCl – Ácido clorídrico 37%

HMRS – Espectrometria de massa de alta resolução

HPA – Eixo hipotálamo-hipófise

HPLC – Cromatografia líquida de alta eficiência

IC₅₀ – Concentração necessária para causar 50% da inibição

ISOPAY – Isopainanteína

ITS – *Internal transcribed spacer*

LC – Cromatografia líquida

LIT – *Linear ion trap*

LLE – Extração líquido-líquido

LOD – Limite de detecção

LOQ – Limite de Quantificação

MAE – Extração assistida por micro-ondas

MDAI – Aminoindano

MDPV – Catinona

MeOH – Metanol

MG – Mitraginina

MG-P – Mitraginina Padrão

MMS – Metilmetasulfonato

MS – Espetrometria de massa

MS/MS – Espetrometria de massa em *tandem*

MSTFA – N-metil-N(trimetilsilil)trifluoroacetamina

MTT – Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólico

NPD – *Nitrogen phosphorus detector*

NPS – Novas substâncias psicoativas

NR – Vermelho neutro

ODT – O-desmetiltramadol

OEDT – Observatório Europeu de Drogas e Toxicodependência

O-TMS – O-trimetilsililado

PAY – Painanteína

PBS – Solução salina de tampão fosfato

PGE2 – Prostaglandina E2

PI – Padrão Interno

PTFE – Politetrafluoroetileno

R^2 – Coeficiente de correlação linear

SEM – Erro padrão da média

SFE-CO₂ – Extração assistida por fluido supercrítico

SNA – Sistema nervoso autónomo

SNC – Sistema nervoso central

SPE – Extração em fase sólida

T – Tramadol

$t_{1/2}$ – Tempo de semi-vida

$T_{\text{máx}}$ – Tempo máximo

TSH – Hormona estimulante da tiróide

UAE – Extração assistida por ultrassons

UPLC – Cromatografia de *ultra-performance*

UV – Detetor ultravioleta

V_d – Volume de distribuição

Lista de Figuras

Figura 1: Planta <i>Mitragyna speciosa</i> : a) folhas, b) flores, c) estrutura da planta, d) folhas, e) planta cultivada. Adaptado de Hassan et al. (2013), Babu et al. (2008) e Adkins et al. (2008).	7
Figura 2: Estrutura química da MG, loimbina, Voacangina e Ibogaína.....	11
Figura 3: Estrutura química da MG e da corinanteidina	12
Figura 4: Relação entre a estrutura e a atividade da MG. Adaptado de Adkins et al. (2011).	13
Figura 5: Estrutura química da 7-OHMG	14
Figura 6: Estrutura química da PAY, ESPG e ESPC	15
Figura 7: Estrutura química da CORY A e B.....	15
Figura 8: Vias metabólicas da MG em ratos (R) e humanos (H). Adaptado de Philipp et al. (2009).	25
Figura 9: Estrutura de um derivado oxidativo da MG: Mitraginina Pseudoindoxilo	29
Figura 10: Aspeto de algumas amostras comerciais de <i>Kratom</i> : A – Amostras de <i>Kratom</i> adquiridas pela Internet e respetivo folheto informativo; B – <i>Kratom Folhas</i> (Kr08F); C – <i>Kratom Bali Resin</i> (Kr10BR); D - <i>Kratom Red Extract 25x</i> (Kr13BEr25x); E - <i>Kratom Gold Extract</i> (Kr12BEg); F- <i>Kratom Bali Extract 15x</i> (Kr11BE15x).....	44
Figura 11: Procedimento de Extração das Amostras Comerciais de <i>Kratom</i>	46
Figura 12: Imagem das soluções do padrão de mitraginina (MG) usadas nos ensaios de citotoxicidade (60, 40, 30, 20, 10, 5 e 2,5 µg/mL).	51
Figura 13: Imagem das soluções de um extrato de uma amostra comercial de <i>Kratom</i> usadas nos ensaios de citotoxicidade (<i>Kratom Bali Resin</i> - 60, 40, 30, 20, 10, 5 e 2,5 µg/mL).	51
Figura 14: Reação de conversão do MTT em cristais de formazano.....	52

Figura 15: Esquema representativo do protocolo do ensaio cometa adotado no presente trabalho.....	56
Figura 16: Extração da MG e análogos com diferentes processos extrativos.	62
Figura 17: Cromatogramas do estudo de Wang et al. (2014): C-1: Mistura Padrão de <i>Mitragyna speciosa</i> ; C-2: Extrato de alcalóides da <i>Mitragyna speciosa</i> ; 1- CORY A/B; 2- PAY; 5- 7-OHMG; 8 – ESPC; 6- MG; 3- Isopainanteína (ISOPAY); 7- ESPG. Adaptado de Wang et al. (2014)	64
Figura 18: Cromatograma em <i>Full Scan</i> do padrão de MG (1) e o seu respetivo espectro de massa (1A).	65
Figura 19: Cromatograma em <i>Full Scan</i> (1) e cromatograma reconstruído com os iões característicos da MG (2) (214, 383, 397, 398, 399 m/z) e o seu respetivo espectro de massa (1A) no extrato Kr11BE15x de uma amostra comercial de <i>Kratom</i>	66
Figura 20: Cromatograma em <i>Full Scan</i> (1) e cromatograma reconstruído com os iões característicos da 7-OHMG (2) (239, 367, 414 m/z) e o seu respetivo espectro de massa (1A) no extrato Kr11BE15x de uma amostra comercial de <i>Kratom</i>	67
Figura 21: Cromatograma em <i>Full Scan</i> (1) e cromatograma reconstruído com os iões característicos da PAY (2) (214, 381, 396 m/z) e o seu respetivo espectro de massa (1A) do extrato Kr11BE15x de uma amostra comercial de <i>Kratom</i>	68
Figura 22: Cromatograma em <i>Full Scan</i> (1) e cromatograma reconstruído com os iões característicos da ESPC (2) (214, 383, 397, 398 m/z) e o seu respetivo espectro de massa (1A) do extrato Kr11BE15x de uma amostra comercial de <i>Kratom</i>	69
Figura 23: Cromatograma em <i>Full Scan</i> (1) e cromatograma reconstruído com os iões característicos da ESPG (2) (214, 383, 397, 398 m/z) e o seu respetivo espectro de massa (1A) no extrato Kr11BE15x de uma amostra comercial de <i>Kratom</i>	70
Figura 24: Cromatograma em <i>Full Scan</i> (1) e cromatograma reconstruído com os iões característicos da CORY A/B (2) (208, 224, 239 e 384 m/z) e o seu respetivo espectro de massa (1A) numa amostra comercial de <i>Kratom</i>	71
Figura 25: Cromatograma em <i>Full Scan</i> do extrato Kr11BE15x de uma amostra comercial de <i>Kratom</i>	72

- Figura 26:** Cromatograma em *Full Scan* (1) e cromatograma reconstruído com os íons característicos do Timol (2) (135, 150 m/z) e o seu respetivo espectro de massa (1A) no extrato Kr11BE15x numa amostra comercial de *Kratom*.73
- Figura 27:** Concentração da CORY A/B, 7-OHMG, ESPC, MG, PAY e ESPG nos extratos das amostras comerciais de *Kratom* do tipo folhas secas partidas (Kr01BF, Kr03TF, Kr05TF, Kr08F).77
- Figura 28:** Concentração da CORY A/B, 7-OHMG, ESPC, MG, PAY e ESPG nas amostras comerciais de *Kratom* do tipo folhas secas em pó (Kr06TP, Kr07MP, Kr09BP)77
- Figura 29:** Concentração da CORY A/B, 7-OHMG, ESPC, MG, PAY e ESPG numa amostra comercial de *Kratom* do tipo extrato em pó (Kr12BEg).78
- Figura 30:** Concentração da CORY A/B, 7-OHMG, ESPC, MG, PAY e ESPG numa amostra comercial de *Kratom* do tipo resina (Kr10BR).....79
- Figura 31:** Imagens representativas de microscopia de contraste de fase de células Caco-2 expostas durante 24 h ao MG-P e a alguns extratos das amostras comerciais de *Kratom* (Kr03TF, Kr07MP, Kr12BEg e Kr10BR): controlo, 10 µg/mL e 60 µg/mL (ampliação 200x).81
- Figura 32:** Imagens representativas de microscopia de contraste de fase de células SH-SY5Y expostas durante 24 h ao MG-P e a alguns extratos das amostras comerciais de *Kratom* (Kr03TF, Kr07MP, Kr12BEg e Kr10BR): controlo, 10 µg/mL e 60 µg/mL (ampliação 200x).82
- Figura 33:** Efeito da mitraginina padrão (MG-P) sobre a viabilidade celular das células Caco-2 (A) e SH-SY5Y (B), avaliado pelo ensaio da captação do vermelho neutro, após 6 e 24 h de exposição a diferentes concentrações (0-60 µg/mL) do referido composto. Os dados encontram-se apresentados como média ± SEM (n=3, em 3 experiências independentes). As curvas concentração-resposta foram obtidas usando o método dos mínimos quadrados (*least squares*) e a comparação entre as curvas foi feita usando o teste F (*extra sum-of-squares F-test*). ****P < 0,000184
- Figura 34:** Efeito da mitraginina padrão (MP-G) sobre a viabilidade celular das células Caco-2 (A) e SH-SY5Y (B), avaliado pelo ensaio da redução do MTT, após 6 e 24 horas de exposição a diferentes concentrações (0-60 µg/mL) do referido

composto. Os dados encontram-se apresentados como média \pm SEM (n=3, em 1 experiência). As curvas concentração-resposta foram obtidas usando o método dos mínimos quadrados (*least squares*) e a comparação entre as curvas foi feita usando o teste F (*extra sum-of-squares F-test*). ****P < 0,0001

.....84

Figura 35: Efeito dos extratos das amostras comerciais de *Kratom* do tipo folhas secas partidas sobre a viabilidade celular das células Caco-2 (A) e SH-SY5Y (B), avaliado pelo ensaio da captação do vermelho neutro, após 6 e 24 horas de exposição a diferentes concentrações (0-60 $\mu\text{g/mL}$) do referido composto. Os dados encontram-se apresentados como média \pm SEM (n=3, em 3 experiências independentes). As curvas concentração-resposta foram obtidas usando o método dos mínimos quadrados (*least squares*) e a comparação entre as curvas foi feita usando o teste F (*extra sum-of-squares F-test*). *P < 0,05; **P < 0,01; ****P < 0,000185

Figura 36: Efeito dos extratos das amostras comerciais de *Kratom* do tipo folhas secas partidas sobre a viabilidade celular das células Caco-2 (A) e SH-SY5Y (B), avaliado pelo ensaio da redução do MTT, após 6 e 24 horas de exposição a diferentes concentrações (0-60 $\mu\text{g/mL}$) do referido composto. Os dados encontram-se apresentados como média \pm SEM (n=3, em 1 experiência). As curvas concentração-resposta foram obtidas usando o método dos mínimos quadrados (*least squares*) e a comparação entre as curvas foi feita usando o teste F (*extra sum-of-squares F-test*). *P < 0,05; **P < 0,01; ***P < 0,00186

Figura 37: Efeito dos extratos das amostras comerciais de *Kratom* do tipo folhas secas em pó sobre a viabilidade celular das células Caco-2 (A) e SH-SY5Y (B), avaliado pelo ensaio da captação do vermelho neutro, após 6 e 24 horas de exposição a diferentes concentrações (0-60 $\mu\text{g/mL}$) do referido composto. Os dados encontram-se apresentados como média \pm SEM (n=3, em 3 experiências independentes). As curvas concentração-resposta foram obtidas usando o método dos mínimos quadrados (*least squares*) e a comparação entre as curvas foi feita usando o teste F (*extra sum-of-squares F-test*). *P < 0,05; **P < 0,01; ****P < 0,000186

Figura 38: Efeito dos extratos das amostras comerciais de *Kratom* do tipo folhas secas em pó sobre a viabilidade celular das células Caco-2 (A) e SH-SY5Y (B), avaliado pelo ensaio da redução do MTT, após 6 e 24 horas de exposição a

diferentes concentrações (0-60 µg/mL) do referido composto. Os dados encontram-se apresentados como média ± SEM (n=3, em 1 experiência). As curvas concentração-resposta foram obtidas usando o método dos mínimos quadrados (*least squares*) e a comparação entre as curvas foi feita usando o teste F (*extra sum-of-squares F-test*). *P < 0,05; ****P < 0,000187

Figura 39: Efeito dos extratos das amostras comerciais de *Kratom* do tipo extratos em pó sobre a viabilidade celular das células Caco-2 (A) e SH-SY5Y (B), avaliado pelo ensaio da captação do vermelho neutro, após 6 e 24 horas de exposição a diferentes concentrações (0-60 µg/mL) do referido composto. Os dados encontram-se apresentados como média ± SEM (n=3, em 3 experiências independentes). As curvas concentração-resposta foram obtidas usando o método dos mínimos quadrados (*least squares*) e a comparação entre as curvas foi feita usando o teste F (*extra sum-of-squares F-test*). **P < 0,01; ****P < 0,0001.....88

Figura 40: Efeito dos extratos das amostras comerciais de *Kratom* do tipo extratos em pó sobre a viabilidade celular das células Caco-2 (A) e SH-SY5Y (B), avaliado pelo ensaio da redução do MTT, após 6 e 24 horas de exposição a diferentes concentrações (0-60 µg/mL) do referido composto. Os dados encontram-se apresentados como média ± SEM (n=3, em 1 experiência). As curvas concentração-resposta foram obtidas usando o método dos mínimos quadrados (*least squares*) e a comparação entre as curvas foi feita usando o teste F (*extra sum-of-squares F-test*). *P < 0,05; **P < 0,01; ****P < 0,000189

Figura 41: Efeito dos extratos das amostras comerciais de *Kratom* do tipo resina sobre a viabilidade celular das células Caco-2 (A) e SH-SY5Y (B), avaliado pelo ensaio da captação do vermelho neutro, após 6 e 24 horas de exposição a diferentes concentrações (0-60 µg/mL) do referido composto. Os dados encontram-se apresentados como média ± SEM (n=3, em 3 experiências independentes). As curvas concentração-resposta foram obtidas usando o método dos mínimos quadrados (*least squares*) e a comparação entre as curvas foi feita usando o teste F (*extra sum-of-squares F-test*). *P < 0,05; ****P < 0,000190

Figura 42: Efeito dos extratos das amostras comerciais de *Kratom* do tipo resina sobre a viabilidade celular das células Caco-2 (A) e SH-SY5Y (B), avaliado pelo ensaio da redução do MTT, após 6 e 24 horas de exposição a diferentes concentrações (0-60 µg/mL) do referido composto. Os dados encontram-se

apresentados como média \pm SEM (n=3, em 1 experiência). As curvas concentração-resposta foram obtidas usando o método dos mínimos quadrados (*least squares*) e a comparação entre as curvas foi feita usando o teste F (*extra sum-of-squares F-test*). ****P < 0,000190

Figura 43: Imagens representativas do ensaio cometa nas células Caco-2, após 24 horas de exposição à mitraginina padrão (MG-P) e aos extratos Kr10BR, Kr11BE15x e Kr12BEg de amostras comerciais de *Kratom*: controlo; veículo (MeOH 0,5%); controlo positivo (MMS 500 μ M); 2,5 μ g/mL e 5 μ g/mL (ampliação 200x).95

Lista de Tabelas

Tabela 1: Principais <i>legal highs</i> - as novas drogas de abuso. Adaptado de Davis et al. (2012).	4
Tabela 2: As dez novas substâncias psicoativas ou <i>legal highs</i> mais divulgadas nas lojas da Internet vigiadas em 2011 e 2012. Adaptado de Observatório Europeu das Drogas (2012).	9
Tabela 3: Principais alcalóides encontrados na <i>Mitragyna speciosa</i> e os seus efeitos farmacológicos. Adaptado de Hassan et al. (2013).	10
Tabela 4: Revisão das técnicas analíticas para a análise qualitativa e quantitativa dos analitos presentes no <i>Kratom</i> e em amostras biológicas dos consumidores..	18
Tabela 5: Parâmetros farmacocinéticos da mitraginina (MG) e da 7-hidroximitraginina (7-OHMG) obtidos em estudos em ratos.	22
Tabela 6: Principais características das amostras comerciais de <i>Kratom</i> adquiridas em <i>smartshops</i> ou pela Internet.	43
Tabela 7: Áreas dos picos cromatográficos da MG e análogos obtidas com diferentes processos extrativos.	61
Tabela 8: Tempo de retenção e iões característicos dos compostos detetados por GC-MS	63
Tabela 9: Gama de concentração linear, curva de calibração e o coeficiente de correlação linear da MG	74
Tabela 10: LOD e LOQ para a MG com o respetivo desvio-padrão e % CV.	74
Tabela 11: Precisão <i>Intra-day</i> e <i>Inter-day</i> do método para a quantificação da CORY A/B, 7-OHMG, ESPC, MG, PAY e ESPG presentes nos extratos das amostras de <i>Kratom</i> analisadas (mg/g de extrato).	75
Tabela 12: Resultados da análise da CORY A/B, 7-OHMG, ESPC, MG, PAY e ESPG em extratos de amostras de <i>Kratom</i> adquiridas nas <i>smartshops</i> e pela Internet (mg/g de amostra).....	76

Tabela 13: Valores de IC ₅₀ obtidos após 24h de exposição das células Caco-2 e SH-SY5Y ao MG-P e a extratos de amostras comerciais de <i>Kratom</i>	92
Tabela 14: Análise do dano de DNA pelo ensaio cometa em células Caco-2 expostas durante 24 h ao padrão de mitraginina (MG-P) e a extratos de 3 amostras comerciais de <i>Kratom</i> : <i>Kratom Bali Resin</i> (Kr10BR - Resina), <i>Kratom Bali Extract 15x</i> (Kr11BE15x – Extrato 15x em pó) e <i>Kratom Gold Extract</i> (Kr12BEg – Extrato em pó).....	94
Tabela 15: Comparação entre as concentrações de MG e 7-OHMG nas amostras comerciais de <i>Kratom</i> num estudo da literatura e no presente estudo.	101
Tabela 16: Valores de IC ₅₀ , calculados no presente estudo, durante 24 horas de exposição das células Caco-2 e SH-SY5Y à MG-P.....	104

Parte I

Introdução

1. Nova tendência no mercado das drogas: emergência de Novas Substâncias Psicoativas (NPS)

Até há alguns anos atrás, as atenções dos organismos europeus em relação às drogas centravam-se essencialmente nas drogas ilícitas naturais e sintéticas. Contudo, recentemente, começou a surgir uma nova tendência no consumo de drogas, com o aparecimento no mercado de novas substâncias psicoativas (NPS) de origem natural ou sintética, não controladas pela legislação vigente, as quais têm sido designadas como *smartdrugs* ou *legal highs*. As NPS estabelecem-se rapidamente como alternativas ao consumo das drogas ilegais pela mimetização dos efeitos da *Cannabis* ou outras drogas estimulantes, como o *ecstasy* ou a cocaína, sendo o seu principal alvo o mercado das drogas consumidas em contextos recreativos [1].

Este novo grupo de substâncias abrange produtos naturais, produtos resultantes de pequenas modificações da estrutura molecular de drogas ilegais e também novas substâncias com estrutura química diferente, mas com ação nos mesmos alvos biológicos que as drogas ilegais. Neste sentido, estão então incluídas tanto as drogas sintéticas, como o 2-aminoindano, a butilona e a mefredona, ou semi-sintéticas provenientes de óleos naturais (e.g. dimetilamila (DMAA)), como também as misturas de ervas naturais, como o *Kratom* e a *Salvia Divinorum*. [2-4]

Para contornar a lei vigente sobre produtos de consumo humano, as NPS são vendidas supostamente como “produtos não destinados ao consumo humano” reservados apenas para “alimentação animal”, “incensos”, “sais de banho” ou “fertilização de plantas”. Normalmente, apresentam-se sob a forma de comprimidos, misturas de ervas, óleos, ou pó, sendo vendidos em pacotes fechados, portadores de diversos símbolos *hippie* ou *new age*. [2-4].

No entanto, estas novas drogas são consideradas um perigo para a saúde pública porque não são previamente submetidas a uma avaliação farmacológica e/ou toxicológica adequada antes da sua introdução no mercado, sendo deste modo difícil especular sobre as suas implicações para a saúde e, por isso, não é de todo garantida a sua segurança para os seus consumidores. Além disso, a identificação das substâncias químicas psicoativas presentes nos produtos poderá ser difícil na medida em que estas podem ser desconhecidas ou vendidas em misturas de vários compostos. Assim sendo, os utilizadores destes produtos não possuem conhecimento suficiente acerca do que estão a

consumir, ignorando tanto as implicações para a sua saúde como as implicações legais dos mesmos [5, 6].

As *smartdrugs* podem ser classificadas em várias categorias de acordo com os seus efeitos: estimulantes, alucinogénios e opióides, entre outras (**Tabela 1**) [7].

Apesar dos consumidores adquirirem frequentemente os produtos pela Internet, a venda das drogas legais também ocorre nas chamadas *smartshops*, *headshops* ou *funshops* localizadas no centro de algumas cidades europeias [1].

O controlo legal das *smartdrugs* é um grande problema para as autoridades responsáveis devido à grande variedade de substâncias psicoativas existentes e à rápida modificação da sua disponibilidade, com a criação de substâncias químicas análogas, como resposta às proibições constantemente introduzidas na legislação [8]. Os produtores destas drogas, após a proibição de determinados produtos, introduzem novas versões destas substâncias com ligeiras mudanças nas fórmulas químicas anteriores, que são comercializadas com um novo e atrativo nome [4]. Esta situação reflete o número crescente destes compostos, como também das suas várias formulações, que surgem no mercado europeu e também no resto do mundo.

Tabela 1: Principais *legal highs* - as novas drogas de abuso. Adaptado de Davis et al. (2012).

Nome	Nomes Alternativos	Efeitos	Substância análoga	Efeitos Clínicos
Sais de Banho	<i>Charge Plus</i>	Estimulante	Anfetamina	Hipertensão
	<i>Cloud 9</i>			Taquicardia
	<i>Hurricane Charlie</i>			Disritmia
	<i>Ivory Wave</i>			Enfarte Miocárdio
	<i>Oceane Snow</i>			Convulsões
	<i>Red Dove</i>			Tremores
	<i>Scarface</i>			Psicose
	<i>White Dove</i>			Paranoia
	<i>White Lightning</i>			
	<i>White Rush</i>			
Ecstasy Legal	<i>Benzo fury</i>	Estimulante	Piperazina	Taquicardia
	<i>Exotic super strong</i>			Palpitações
	<i>Head Rush</i>			Prolongamento do intervalo QT
	<i>MDAI</i>			Dor de cabeça
	<i>Party pills</i>			Convulsões
	<i>XXX Strong as Hell</i>			Ansiedade
Metanfetamina	<i>Potenay</i>	Estimulante	Anfetamina	Mesmo dos Sais de Banho
	<i>Potemax</i>			
Incenso de Ervas	<i>Black Magic</i>	Alucinogénio	Canabinóide	Taquicardia Supraventricular
	<i>Cloud 9</i>			Convulsões
	<i>K2</i>			Psicose
	<i>Smoke</i>			Paranóia
	<i>Spice Diamond</i>			
	<i>Spice Gold</i>			
Metoxetamina	<i>Special k</i>	Alucinogénio	Cetamina	Taquicardia
				Hipertensão
				Confusão
				Nistagmo
Salvia	<i>Diviners Sage</i>	Alucinogénio	Salvinorina-A	Alucinações
	<i>Magic Mint</i>			
	<i>Maria pastora</i>			
	<i>Purple Sticky</i>			
	<i>Sally D</i>			
Kratom	<i>Ithang</i>	Opióide	Mitraginina	Em doses baixas: efeitos dos estimulantes
	<i>Kakuam</i>			Em doses elevadas: efeitos dos opióides
	<i>Ketum</i>			
	<i>Krypton</i>			
	<i>Thom</i>			
Xilazina	<i>Anestesia de Caballo</i>	Tranquilizante	Xilazina	Úlceras de pele

2. *Mitragyna speciosa* (Kratom)

Uma das drogas naturais mais utilizadas na Europa é o *Kratom*, uma mistura de alcalóides extraída da planta *Mitragyna speciosa*, com propriedades estimulantes e sedativas, atuando desta forma como estimulante ou opióide.

Outrora, a *Mitragyna speciosa* foi utilizada para fins medicinais pelos nativos da Malásia e da Tailândia, contudo nos dias de hoje é utilizada com a finalidade recreativa, tal como a maior parte das NPS [9]. Nestes países, esta planta foi cultivada em grande escala pelo imenso consumo da população, embora em doses reduzidas, devido ao seu efeito euforizante [10]. Em doses mais elevadas, o *Kratom* tem sido administrado para tratar a dor e a dependência do ópio, sendo este um substituto da morfina, visto que nestas doses apresenta efeitos idênticos aos opiáceos [11]. No entanto, esta droga já se tornou ilegal nestes países há vários anos, em conjunto com o Myanmar e o Vietname e, mais recentemente, na Austrália [11, 12].

Esta droga é conhecida e vendida com variadíssimos nomes, nomeadamente *Ithang*, *Kakuam*, *Krypton*, *Thom* e *Biak-Biak*, sendo algumas destas designações mais específicas de certos países do que outras [7]. Esta pode ser fumada, no caso das folhas secas, bebida como um chá ou até ser mastigada [12, 13]. Os utilizadores habituais desta droga consomem cerca de 1 a 3 folhas em cada dose, repetindo o seu consumo entre 3 a 10 vezes ao dia [13].

Em várias lojas *online*, ou nas *smartshops*, existem vários tipos de produtos diferentes: folhas secas, folhas reduzidas a pó, extratos em pó com diferentes tipos de ação, resinas, óleos essenciais e gotas. Consoante o tipo e local do produto adquirido, bem como a sua quantidade e qualidade, o preço pode variar. Segundo uma pesquisa do Observatório Europeu das Drogas e Toxicodependência (OEDT) de 2011, um grama de extrato “*Kratom 15x*” custa entre 7 a 8 €, enquanto 10 g de folhas secas custam entre 6 a 15 € nos países europeus [13].

Às preparações do *Kratom* são muitas vezes adicionados componentes sintéticos ativos, como o O-desmetiltramadol, um metabolito ativo do tramadol, para potenciar os seus efeitos psicoativos [7, 11, 12, 14].

Como reportado pelo OEDT, o *Kratom* tem sido a droga mais vendida, através da Internet, desde 2011 [15]. Para este crescimento gradual da sua comercialização contribuiu o facto de esta ser considerada uma “droga alternativa”, pois é aconselhada pelas comunidades *online* para atenuar os sintomas da abstinência relacionados com a

dependência de morfina ou de derivados do ópio. Neste sentido, esta *legal high* tem sido amplamente utilizada por vantagem económica em relação às outras drogas [16].

2.1. Origem Botânica

A *Mitragyna speciosa* faz parte da família das Rubiaceae. As plantas desta família caracterizam-se pelas suas propriedades psicoativas, como a planta do café (*Coffea*) ou a *Uncaria*, uma planta medicinal vulgarmente conhecida como Unha de Gato. O género *Mitragyna* é relativamente pequeno visto que apenas compreende 10 espécies de plantas em todo o mundo, sendo que seis delas foram encontradas no Sudeste da Ásia [17, 18]. De facto, a *Mitragyna speciosa* é uma planta particularmente cultivada no Sudeste da Ásia, outrora com especial importância a nível medicinal nesta região. Ainda continua a ser utilizada tradicionalmente pelos indígenas como estimulante para o combate da fadiga e no trabalho árduo durante as horas de grande calor, mas também como analgésico para o alívio da dor em determinadas patologias. Além disso, também é usada como um substituto do ópio para a dependência da morfina. Esta planta é conhecida como *Biak-Biak* na Malásia e *Kratom* na Tailândia, sendo atualmente proibida em ambos os países devido aos seus potenciais efeitos opióides e narcóticos [19]. Contudo, é na Indonésia que esta planta terá o seu maior cultivo, pois não há qualquer controlo desta droga, havendo vários produtos que se designam por “Bali *Kratom*” [13].

As plantas de *Mitragyna speciosa* crescem normalmente até 4 a 9 m de altura e 5 m de amplitude, atingindo algumas, exceccionalmente, 15 a 30 m. Elas crescem melhor em solo húmido e fértil com exposição solar média a completa e em áreas abrigadas de ventos fortes. O seu caule é ereto e ramificado. As suas folhas, de forma oval e extremidades afiadas, apresentam uma coloração brilhante verde escura, crescendo até atingirem mais de 18 cm de comprimento e 10 cm de largura. As folhas caem com abundância durante a estação seca do ano, crescendo maioritariamente na estação chuvosa. Contudo, nestas plantas existe alguma folhagem persistente dependendo das condições ambientais a que estão expostas. As partes da *Mitragyna speciosa* utilizadas para o consumo são exatamente as folhas e os caules mais pequenos desta planta (**Figura 1**). [20, 21].

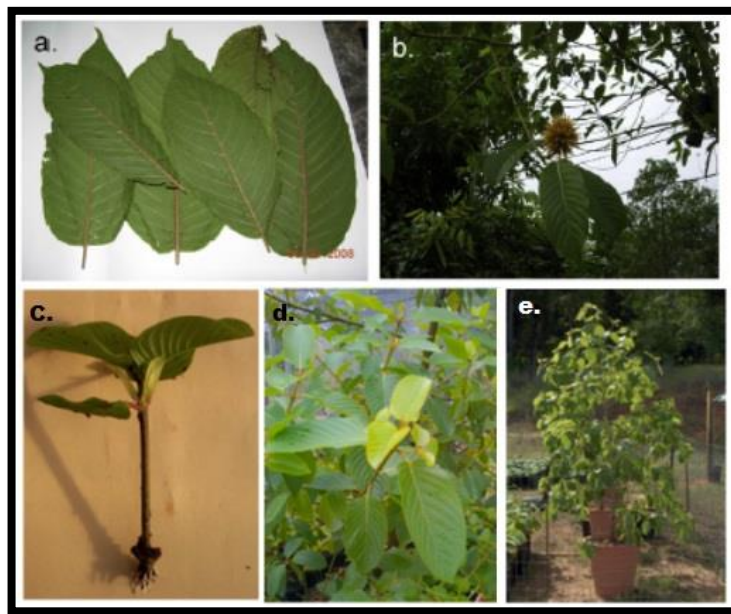


Figura 1: Planta *Mitragyna speciosa*: a) folhas, b) flores, c) estrutura da planta, d) folhas, e) planta cultivada. Adaptado de Hassan et al. (2013), Babu et al. (2008) e Adkins et al. (2008).

A identificação desta espécie não é muito fácil devido às ligeiras diferenças entre as folhas das plantas visto que algumas delas podem conter veios vermelhos, para além dos verdes, e também variação nas pontas. Esta dificuldade constitui um grave problema na Tailândia na medida em que os indígenas ainda as utilizam para os mais diversos fins, sendo difícil para as autoridades competentes identificar as plantas consumidas e, consequentemente, controlar esse consumo prejudicial. Além disso, devido às condições propícias ao crescimento da *Mitragyna speciosa*, esta cresce amplamente em todo o país, o que também dificulta a sua monitorização [17, 18].

Como resolução do problema de identificação desta espécie, e também de outras espécies pertencentes ao género *Mitragyna*, atualmente começam a ser realizadas análises de biologia molecular para a sua identificação genética e autenticação para fins forenses e medicinais [17, 20]. A sequenciação dos *Internal Transcribed Spacer* (ITS) do DNA nuclear ribossomal das várias espécies é uma dessas soluções porque se verifica um elevado grau de variação dos ITS entre espécies estreitamente relacionadas. Contudo, tem limitações na medida em que não permite saber nem os diferentes teores de alcalóides naturais encontrados dentro da mesma espécie, nem diferenças nas folhas da mesma planta com características morfológicas diferentes [17, 20, 22].

2.2. Prevalência, Controlo e Legislação

O *Kratom* surgiu no mercado global de drogas muito recentemente, por isso não existem muitas informações da extensão do seu uso fora do Sudeste Asiático. Dentro desta região, mais propriamente na Tailândia, segundo uma pesquisa nacional domiciliar em 2007, observou-se que o *Kratom* foi a segunda droga mais utilizada, depois da *Cannabis*. Além disso, no sul da Tailândia, nas áreas onde a *Mitragyna speciosa* é nativa, registaram-se dados de prevalência bastante acima da média. Em 2011, a utilização desta droga como tratamento para a dependência de outras constituiu apenas 2% dos casos admitidos, contudo o seu consumo tem vindo a aumentar desde 2007, registando-se um aumento exponencial das admissões para os tratamentos relacionados com o *Kratom*. Ainda neste país, entre 2005 e 2011, o número de apreensões desta droga quintuplicou, ultrapassando os dados de outras drogas bem conhecidas (heroína, ópio, ketamina, ecstasy e cocaína), o mesmo acontecendo nos países vizinhos como o Myanmar e a Malásia [13, 23-25].

Para além do Sudeste da Ásia, uma ampla utilização do *Kratom* também foi registada na República da Coreia e, nos últimos anos, foi reportado o seu uso em vários países norte-americanos, europeus e do Médio Oriente [24, 26].

Na Europa, segundo inquéritos realizados na Internet pelo OEDT em 2008, o *Kratom* foi uma das drogas legais mais amplamente vendidas através das lojas *online* (44%), estando à sua frente a *Salvia divinorum* (74%), as cápsulas estimulantes (59%) e as sementes de *Hawaiian Baby Woodrose* (48%). Mais recentemente, estudos realizados também na Internet pelo OEDT em 2011 e 2012, verificaram que o *Kratom* foi a *smartdrug* mais procurada nestas lojas *online*, cuja disponibilidade tem vindo a aumentar, havendo uma regressão na procura da *Salvia divinorum* (**Tabela 2**). Também no Reino Unido, em 2009, foi realizado um estudo semelhante, onde o *Kratom* se revelou a segunda droga mais procurada na Internet, sendo a primeira a *Salvia divinorum* [13, 15].

Tabela 2: As dez novas substâncias psicoativas ou *legal highs* mais divulgadas nas lojas da Internet vigiadas em 2011 e 2012. Adaptado de Observatório Europeu das Drogas (2012).

	Número de lojas que vendem o produto		
	Janeiro 2011	Julho 2011	Janeiro 2012
<i>Kratom</i> (natural)	92	128	179
<i>Salvia</i> (natural)	72	110	134
Cogumelos alucinogénios (natural)	44	72	95
Metoxetamina (arilciclohexilamina)	14	58	68
MDAI (aminoindano)	45	61	65
6-APB (benzofurano)	35	49	54
MDPV (catinona)	25	32	44
4-MEC (catinona)	11	32	43
Metilpropamina (tiofeno)	5	28	39
5-IAI (aminoindano)	25	27	38

Apesar desta droga, tal como os alcalóides que constituem a sua planta, não constarem em nenhuma lista da *United Nations Convention*, o *Kratom* e os seus alcalóides começaram a sofrer algum tipo de controlo por autoridades competentes em vários Estados-Membros da União Europeia, como a Dinamarca, Letónia, Lituânia, Polónia, Roménia, Suécia e, mais recentemente, em Portugal. Fora da Europa, a Austrália, a Malásia, a Tailândia e o Myanmar são outros países que controlam também o *Kratom* pela sua legislação de agentes narcóticos. Na Nova Zelândia, o controlo do *Kratom* e dos seus alcalóides é feito através do *Medicines Amendment Regulations*. Pelo contrário, nos Estados Unidos da América esta droga não sofre qualquer tipo de regulamentação, apesar de ser considerada uma *drug of concern* [13].

Em Portugal, o *Kratom* foi considerado ilegal, sendo proibida a sua comercialização a partir de 2013, encontrando-se discriminado na lista de Novas Substâncias Psicoativas Proibidas no Decreto-Lei nº54/2013 por ser uma das *smartdrugs* mais vendidas no país [27]. Também na ilha da Madeira, em 2012, foi criado um novo Decreto Legislativo Regional nº28/2012/M destinado a ilegalizar também a maior parte das NPS existentes, onde o *Kratom* também se insere por ser uma das *smartdrugs* mais vendidas no país [28]. No entanto, é necessário prever o seu potencial risco para a saúde pública e os riscos sociais associados, visto que é uma droga ainda vendida livremente em vários países e facilmente adquirida através da Internet.

2.3. Fitoquímica

Ao longo dos últimos anos, foram isolados e caracterizados quimicamente 44 compostos extraídos da *Mitragyna speciosa* (**Tabela 3**). O teor de alcalóides presente nos extratos da planta depende da região geográfica e da estação do ano em que a planta é colhida [17, 20].

Tabela 3: Principais alcalóides encontrados na *Mitragyna speciosa* e os seus efeitos farmacológicos. Adaptado de Hassan et al. (2013).

Alcalóides	Percentagem no extrato da planta	Efeitos farmacológicos e/ou fisiológicos
Mitraginina	66%	Agonista Adrenérgico, Analgésico, Antitússico, Antidiarreico, Antimalárico
Painanteína	9%	Suave Relaxante Muscular
Especioginina	7%	Suave Relaxante Muscular
7-Hidroxitmitraginina	2%	Analgésico, Antitússico, Antidiarreico
Especiociliatina	1%	Fraco Agonista Opióide
Mitrafilina	<1%	Vasodilatador, Anti-hipertensor, Relaxante Muscular, Diurético, Antiamnésico, Imunoestimulante, Anti-neoplásico
Isomitrafalina	<1%	Imunoestimulante, Antileucémico
Especiofilina	<1%	Anti-neoplásico
Rincofilina	<1%	Bloqueador dos canais de cálcio, Vasodilatador, Anti-hipertensor, Antiagregante plaquetário, Anti-inflamatório, Antipirético, Antiarrítmico
Isorincofilina	<1%	Imunoestimulante
Ajmalicina	<1%	Antiadrenérgico, antiagregante plaquetário, sedativo, anticonvulsivante, suave relaxante muscular
Corinantadeína	<1%	Agonista Opióide
Corinoxina A	<1%	Depressor da locomoção, Bloqueador dos canais de cálcio
Corinoxina B	<1%	Depressor da locomoção
Mitrafolina	<1%	-
Isomitrafalina	<1%	-
Oxindole A	<1%	-
Oxindole B	<1%	-
Especiofolina	<1%	Analgésico, antitússico
Isoespeciofolina	<1%	-
Ciliafilina	<1%	Analgésico, antitússico
Mitraciliatina	<1%	-
Mitraginalina	<1%	-
Ácido Mitraginalínico	<1%	-
Ácido Corinantedainico	<1%	-

Embora existam dezenas de compostos identificados na planta do *Kratom*, os principais alcalóides presentes, apresentando-se num teor igual ou superior a 1% na planta, são a mitraginina (MG) e seus análogos: a painanteína (PAY), a especioginina (ESPG), a 7-hidroximitraginina (7-OHMG) e a especiociliatina (ESPC). A 7-OHMG é um novo alcalóide isolado recentemente, sendo um dos constituintes minoritários na planta, contudo apresenta uma elevada atividade psicoativa em exposições crônicas [20, 29, 30]. Outros alcalóides, nomeadamente a corinoxina A (CORY A) e a corinoxina B (CORY B), apesar de estarem presentes também apenas numa quantidade mínima na planta (inferior a 1%), foram identificados na mesma proporção dos outros alcalóides minoritários [20, 31].

Quanto às estruturas moleculares de todos os alcalóides encontrados na *Mitragyna speciosa*, estas podem ter no núcleo base um grupo indol substituído com um grupo metoxilo na posição do C9, e um anel E aberto substituído na posição C17, ou então, um grupo oxindol sem substituição na posição C9 com o anel E fechado [32]. Estruturalmente, tanto a MG como os seus análogos possuem três estereocentros, posicionados no C3, C15 e C20, permitindo esta estereoisomeria a distinção entre alguns alcalóides da planta [33]. As suas estruturas estão relacionadas com a ioimbina, um fármaco alcalóide usado para o tratamento de disfunção sexual, e com a voacangina, outro alcalóide usado para a semi-síntese da ibogaína - uma droga utilizada como alucinogénio e nos tratamentos alternativos de dependência dos opiáceos (**Figura 2**) [20].

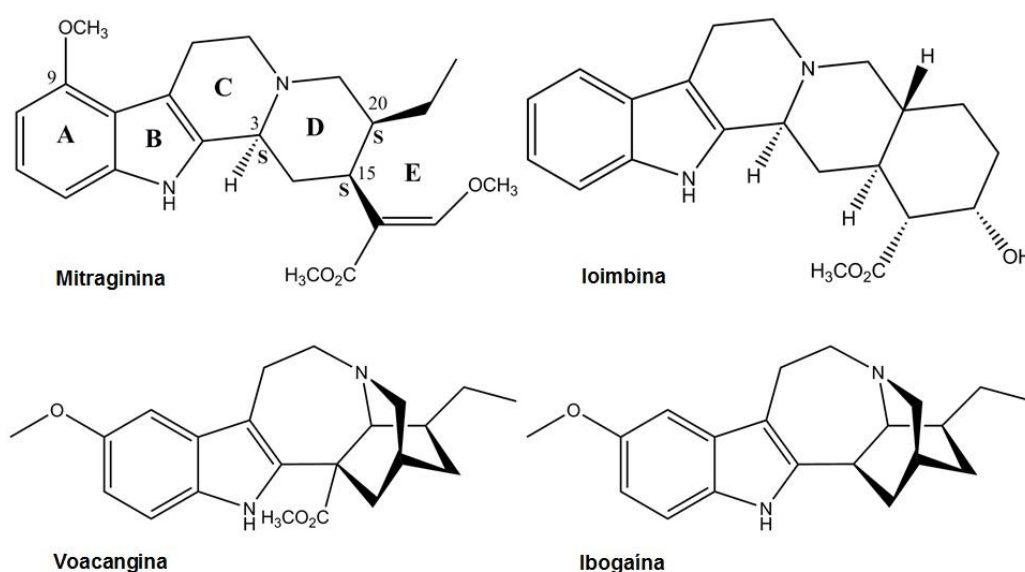


Figura 2: Estrutura química da MG, ioimbina, Voacangina e Ibogaína

2.3.1. Mitraginina

A MG, um alcalóide da família dos alcalóides do género *Corynanthe* presente em 66% no extrato da planta, é o mais abundante e ativo da *Mitragyna speciosa* [20, 34]. Este alcalóide tem propriedades semelhantes às da morfina, contudo não é o principal responsável pela psicoatividade do *Kratom* pois, um dos outros alcalóides existentes na planta, a 7-OHMG, potencia os seus efeitos. A MG foi isolada pela primeira vez por Hooper, em 1907, mais tarde por Field (1921) e por Ing e Raison (1939) [35-37]. A estrutura da molécula foi determinada em 1965, por Zacharias e colaboradores, através de cristalografia de raios-X [38]. Depois de conhecida a sua estrutura, começaram a surgir tentativas para a sua síntese, sendo a primeira descrita em 1995 por Takayama e colaboradores [39].

Quimicamente, a MG é a 9-metoxi-corinanteidina, com uma estrutura semelhante à corinanteidina, no entanto tem uma substituição na posição C9 com um grupo metoxilo. Este grupo metoxilo no C9 é característico dos alcalóides da *Mitragyna speciosa* distinguindo-os de todos os restantes alcalóides característicos do género *Corynanthe* (**Figura 3**). Relacionando a estrutura química da MG com a sua atividade biológica, este grupo funcional é essencial para a sua atividade ao nível do sistema nervoso central, contribuindo para a sua atividade como analgésico [19, 40, 41].

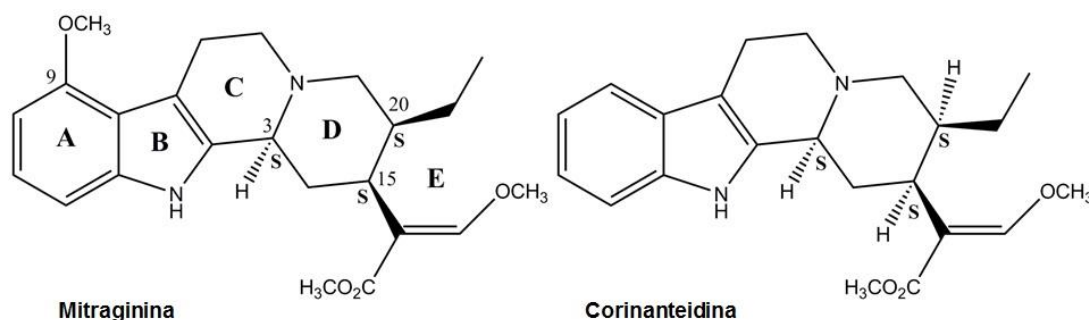


Figura 3: Estrutura química da MG e da corinanteidina

No entanto, se a estrutura da molécula for ligeiramente modificada, as suas propriedades biológicas vão ser diferentes: a substituição do grupo metoxilo por um grupo alcóxido anula a sua atividade; a eliminação do grupo metoxilo revertendo a estrutura original de corinanteidina com atividade antagonista e a introdução de um grupo hidroxilo na posição C7 aumenta drasticamente a sua atividade (**Figura 4**) [33]. A MG atua como estimulante em doses baixas, e como opióide e depressor do sistema nervoso central (SNC), em doses mais elevadas [7].

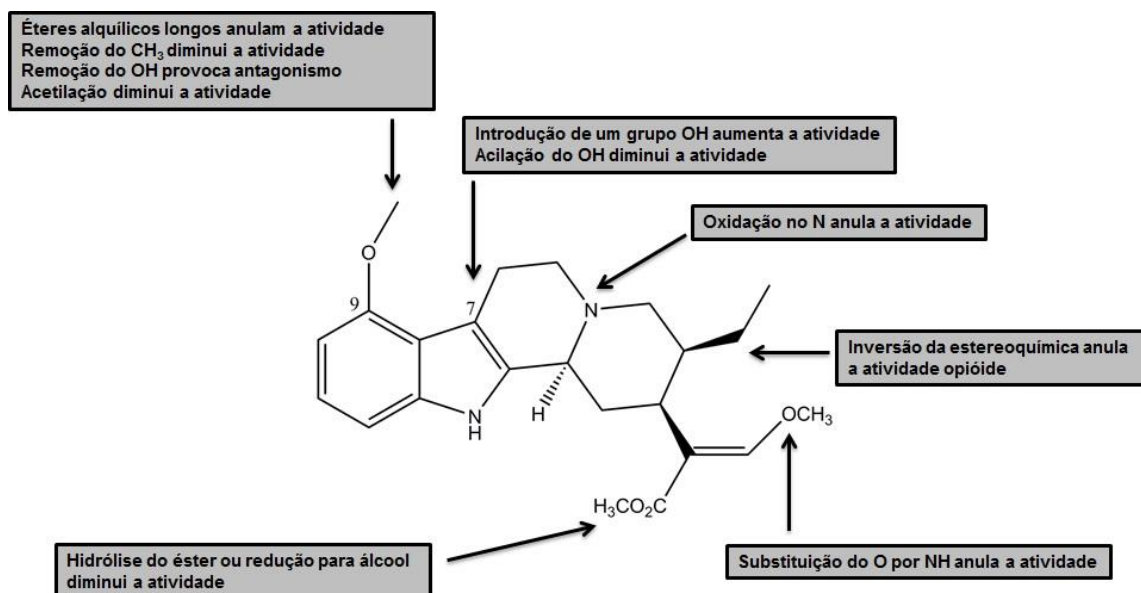


Figura 4: Relação entre a estrutura e a atividade da MG. Adaptado de Adkins et al. (2011).

Quanto à sua solubilidade, a MG é solúvel em acetona, ácido acético, clorofórmio, éter dietílico e na maioria dos álcoois [13] .

2.3.2. 7-Hidroximitraginina

Um dos constituintes minoritários presentes na *Mitragyna speciosa*, apenas com um teor de 2% no extrato da planta, mas que exibe a atividade mais potente é a 7-OHMG. Este alcalóide é um derivado oxidado da MG, com a introdução de um grupo hidroxilo na posição C7, provocando assim o aumento da sua atividade em relação à própria MG (**Figura 5**). Este facto é comprovado com vários estudos, sendo normalmente utilizado o cálculo dos valores de pD2 ($pD2 = -\log EC_{50}$; EC_{50} é a concentração que produz 50% do efeito máximo possível para o agonista, designada também de concentração eficaz) para avaliar a potência dos alcalóides presentes na *Mitragyna speciosa* e a sua afinidade para a ligação aos recetores. Os valores de pD2 para a 7-OHMG são muito superiores quer em relação à MG, quer à própria morfina, o que permite sugerir que o efeito opióide do *Kratom* poderá ser sobretudo devido à atividade da 7-OHMG [17, 42-44].

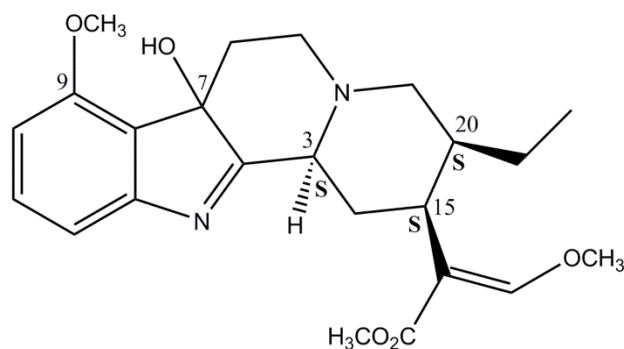


Figura 5: Estrutura química da 7-OHMG

2.3.3. Painanteína, Especioginina e Especiociliatina

A PAY, a ESPG e a ESPC, também presentes nos extratos de *Mitragyna speciosa* na quantidade de 9%, 7% e 1% respetivamente, são análogos da MG fazendo parte dos alcalóides característicos do género *Corynanthe*. Todos estes alcalóides foram isolados, pela primeira vez, pouco depois de ter sido estudada e caracterizada a estrutura da MG, em 1965. Quanto às diferenças estruturais entre estes alcalóides, a MG e a ESPG apenas diferem na configuração do estereocentro no C20, sendo por isso diastereoisómeros. Pelo contrário, a ESPG e a PAY possuem configurações semelhantes no estereocentro do C20, distinguindo-se a nível dos substituintes: a ESPG possui um grupo etilo na posição C20 em vez de um grupo vinilo, como no caso da PAY (**Figura 6**). Quanto ao metabolismo da PAY, da ESPG e da ESPC, existem alguns estudos que abordam o assunto, contudo este ainda não foi devidamente explicado e desvendado, sendo esta a razão para não se conhecerem concretamente as suas atividades biológicas [33].

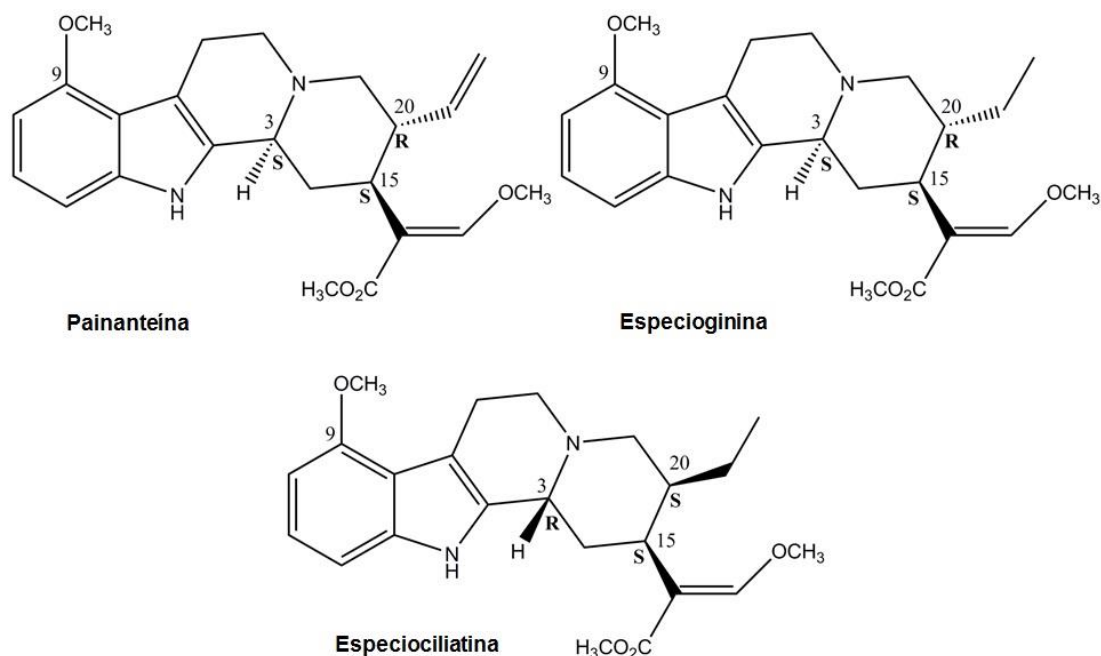


Figura 6: Estrutura química da PAY, ESPG e ESPC

2.3.4. Corinoxina A e Corinoxina B

A CORY A e B são alcalóides característicos do género *Uncaria*, estando presentes na *Mitragyna speciosa* apenas num teor inferior a 1% [20, 45, 46]. Estes alcalóides distinguem-se da MG e análogos principalmente pelo seu anel C ter apenas 5 átomos de carbono, em vez dos 6 átomos nos outros alcalóides. Além disso, a CORY A e B também não são substituídas na posição C9 por um grupo metoxilo, o que as diferencia. Entre a CORY A e a CORY B a diferença está apenas na configuração do estereocentro no C7, sendo por isso diastereoisómeros (**Figura 7**).

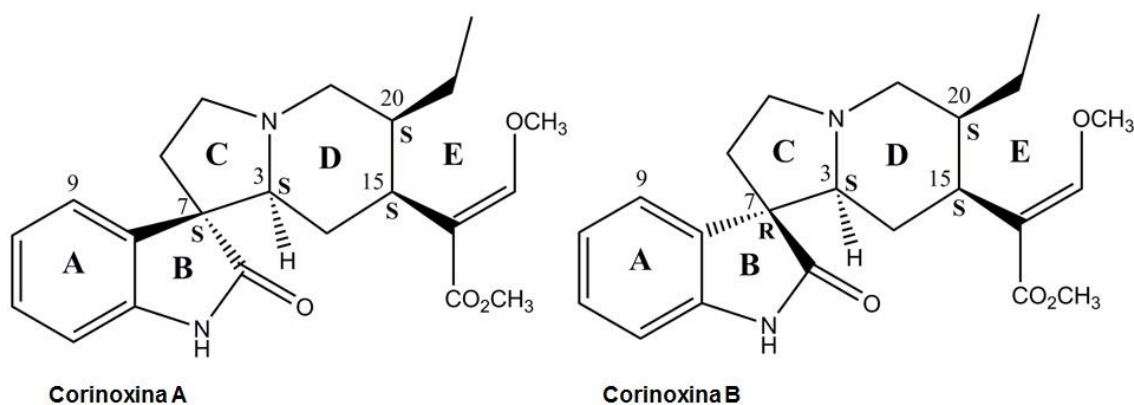


Figura 7: Estrutura química da CORY A e B.

Quanto aos seus mecanismos de ação e atividade biológica, é conhecido que ambos os alcalóides provocam uma depressão na atividade locomotora via sistema dopaminérgico do SNC, contendo possivelmente efeitos sedativos mediados por este sistema. Contudo, neste estudo, a CORY A e B foram isoladas de várias plantas do género *Uncaria* e não da *Mitragyna speciosa* [47]. Mais recentemente, observou-se que estes compostos promovem a autofagia e aumentam a atividade lisossomal das células neuronais, podendo desta forma auxiliar a prevenção ou o tratamento de doenças neurodegenerativas. No entanto, também nestes estudos, estes alcalóides foram isolados da planta *Uncaria rhynchophylla*, uma planta usada frequentemente na Medicina Tradicional Chinesa [48, 49]. Quanto a pesquisas efetuadas sobre estes compostos na *Mitragyna speciosa*, não existem quaisquer informações na literatura.

2.3.5. Técnicas Analíticas

O desenvolvimento de métodos analíticos é extremamente necessário para se proceder à identificação e quantificação dos compostos presentes no *Kratom*, bem como para pesquisar os seus constituintes e metabolitos em amostras biológicas dos consumidores em casos de intoxicação.

Na **Tabela 4** estão referenciados vários métodos cromatográficos que foram desenvolvidos para a identificação e quantificação dos compostos presentes em produtos de *Kratom* comercializados, plantas *Mitragyna speciosa*, e em amostras biológicas *ante- e post-mortem*, sendo estes de grande importância em análises toxicológicas de índole clínica e forense. Dentro destes métodos estabelecidos, alguns foram utilizados para o estudo do metabolismo dos alcalóides presentes no *Kratom*, sendo de grande importância para a pesquisa de eventuais biomarcadores de abuso desta droga [50-53]. Um destes métodos analíticos explorados também ajudou no prognóstico de pacientes, já que foram desenvolvidos em casos de doentes intoxicados e hospitalizados por esta droga [54]. Nos casos de estudo *post-mortem*, estas técnicas analíticas auxiliaram a descoberta da causa de morte dos intoxicados [14, 55]. No entanto, apenas 25% destes métodos estão direcionados para as amostras comerciais, ainda que a maior parte apenas os identifique, mas não os quantifique [54, 56-60]. Igualmente, metade destes métodos inclui só a MG como analito e não procura as restantes substâncias com elevada atividade psicoativa, ou substâncias potencialmente perigosas para a saúde e contaminantes [56, 58, 60].

A análise de amostras biológicas foi feita predominantemente em urina já que a MG e os outros alcalóides presente no *Kratom*, além de serem extensivamente

metabolizados, a sua excreção é essencialmente urinária, estando assim estes, assim como os seus metabolitos, bastantes concentrados nesta matriz. Desta forma, eles são mais facilmente identificáveis na urina e, por isso, muito úteis principalmente nos testes de *screening* [50-53, 55, 61-64]. Contudo, é importante também a sua quantificação em outras amostras, para efeitos de estudos de toxicocinética, havendo por isso análises em soro e plasma [14, 55, 65-68].

Nos métodos analíticos para a análise de amostras de *Kratom* e da planta *Mitragyna speciosa* apenas um deles utilizou padrão interno (PI), a betametasona, para a respetiva validação [59]. Para a análise da MG e análogos em amostras biológicas, vários compostos foram utilizados como PI: acenafteno, ajmalicina, amitriptilina, mefloquina, proadifeno, LSD-d₃, mitrafilina e triptolina [14, 55, 62, 63, 65-68].

Para o estudo do melhor processo de extração dos alcalóides presentes nas folhas de *Mitragyna speciosa*, Orio et al. (2012) recorreram à extração assistida por ultrassons (UAE), à extração assistida por micro-ondas (MAE) e à extração por fluido supercrítico CO₂ (SFE-CO₂) em comparação com os métodos de extração convencionais com calor, sendo os extratos posteriormente analisados por cromatografia líquida de alta eficiência com sistema de ionização por eletrospray e espetrometria de massa (HPLC-ESI-MS). Deste modo, testando vários solventes e condições experimentais, observaram que a MAE (110°C, 60W) com a mistura de solventes metanol: água (1:1) permitiu obter uma maior fração de alcalóide, enquanto a UAE (25°C; 21,4 kHz; 50W) com metanol se obteve um maior rendimento para a MG. Com este resultado, os autores concluíram que a UAE é o método mais eficaz para se obter uma maior quantidade de alcalóides, sendo um procedimento favorável a adotar na identificação e quantificação dos alcalóides do *Kratom* [69].

Tabela 4: Revisão das técnicas analíticas para a análise qualitativa e quantitativa dos analitos presentes no *Kratom* e em amostras biológicas dos consumidores

Análitos	Amostra	Preparação da Amostra	Padrão Interno	LOD	LLOQ	Método	Referência
Mitraginina	<i>Kratom</i> Comercial em folhas, pó, bebidas e chás	Amostras sólidas: 1. Extração em clorofórmio:metanol (1:4) 2. Ultrassons (10 min)	-	-	-	GC-FID	[56]
		Amostras líquidas: 1.LLE com éter dietílico após acidificação 2.LLE da fase aquosa com clorofórmio após alcalinização 3.Ressuspensão em metanol				GC-MS	
Mitraginina 7-hidroxi mitraginina Especioginina Especioclatina Painanteína	<i>Kratom</i> comercial em folhas, pó e resina	1.Extração por ultrassons com solução 80% metanol (1h) 2. Centrifugação (5 min)	Betametasona	-	-	LC-ESI-MS	[59]
Mitraginina Rincofilina	<i>Kratom</i> em pó	1. Extração com etanol 2. Centrifugação 3. Ressuspensão em acetato de etilo	-	-	-	GC-MS	[54]
Mitraginina Codeína Cafeína Clorfeniramina Fenilefrina	<i>Kratom</i> <i>Cocktail</i>	Filtração através de uma membrana de nylon (0,2 µm) após a reconstituição do <i>Kratom</i> na fase móvel metanol: água (80:20)	-	1,000 0,005 0,005 0,200 0,200 µg/mL	3,000 0,010 0,010 0,400 0,400 µg/mL	HPLC-DAD	[57]
Mitraginina	<i>Kratom</i> comercial em folhas e pó	1.Extração com etanol 2.Ultrassons (30 min) 3.Filtração	-	1 µg/mL	-	HPLC	[60]
Mitraginina	Amostra Comercial <i>Kratom 10x</i>	1.Extração com metanol 2.Ultrassons (20 min) 3.Centrifugação (5 min, 1.000 g) 4.Filtração com membrana PTFE 0,45 µm	-	-	-	GC-MS	[58]
Mitraginina Secologanina Triptofano Triptamina	Planta <i>Mitragyna speciosa</i>	1.Extração com metanol (1h, 70°C) 2.Filtração 3.LLE com éter de petróleo	-	0,2 0,2 0,6 0,6 µg/mL	1,2 1,2 2,4 2,4 µg/mL	HPLC-DAD	[70]

Mitraginina	Plantas do gênero <i>Mitragyna</i>	1.Extração com clorofórmio:metanol (1:4) 2. Ultrassons (30°C, 1h) 3.Filtração com membrana nylon 0,45 µm	-	-	-	GC-MS	[71]
Mitraginina Painanteína Isopainanteína Especioginina Especiociliatina Corinoxina A/B	Planta <i>Mitragyna speciosa</i>	1.Extração com metanol (24h) 2.Ressuspensão em 5% HCl em água 3.LLE com acetato de etilo após alcalinização	-			UPLC-MS-DAD	[31]
						SFC-DAD	
						GC-MS	
Mitraginina 9-hidroxicorinanteína Derivados O-TMS	Urina Humana	LLE com metil <i>tert</i> -butil éter após a alcalinização da urina	-	Screening		GC-MS	[61]
		1.SPE (<i>Amberlite XAD-2</i>): eluição com metanol 2.Hidrólise Enzimática (1h; 50°C) seguida de alcalinização 3. LLE com éter metil <i>tert</i> -butílico 4. Derivatização com MSTFA:NH ₄ l:etanotol 1000:2:6 (15 min; 60°C)					
Mitraginina	Soro Humano e de Rato	LLE com éter dietílico, depois da alcalinização do soro	Acenafteno	0,03 µg/mL	0,1 µg/mL	HPLC-UV	[65]
Metabolitos de fase I e II da Mitraginina	Urina Humana e de Rato	Metabolitos de fase I: 1.Diluição da urina em água purificada (1:2) seguida de acidificação 2.Hidrólise Enzimática (1,5h; 50 °C) 3. SPE (<i>HCM</i>): eluição com metanol: amoníaco em solução aquosa (98: 2)	-	Screening		LC-LIT-MS	[53]
		Metabolitos de fase II: 1.Diluição da urina em água purificada (1:2) 2.SPE (<i>C18</i>): eluição com metanol					
Mitraginina	Urina Humana	LLE com éter metil <i>tert</i> -butílico após alcalinização da urina	Ajmalicina	20 µg/mL	100 µg/mL	HPLC-ESI-MS/MS	[63]
Mitraginina	Plasma de Rato	LLE com álcool hexano-isoamílico após alcalinização do plasma	Amitriptilina	-	200 µg/mL	LC-ESI-MS/MS	[66]
Mitraginina	Plasma Humano e de Rato	1.Desproteíntização com ácido hidrocloreto após acidificação do plasma 2. SPE (<i>MCX</i>): eluição com solução 5% amoníaco em metanol	Mefloquina	0,025 µg/mL	0,050 µg/mL	HPLC-UV	[67]
Mitraginina (MG) Especioginina Especiociliatina	Sangue, Urina e Órgãos <i>Post-mortem</i>	1.Hidrólise enzimática (1,5h; 55°C) 2. Extração com acetonitrilo 3. Centrifugação (3000 rpm, 5 min)	Proadifeno	0,25 µg/mL (MG)	1 µg/mL (MG)	LC-MS-MS	[55]

Painanteína 17-O-desmetilhidromitraginina 7-hidroxitmitraginina 9-O-desmetilmitraginina 16-carboximitraginina			4. LLE com solução tampão carbonato (0,1 M, pH 9,3) e cloreto de n-butilo 5. Centrifugação (3000 rpm, 5 min) 6. Ressuspensão em 0,1% de ácido fórmico/acetonitrilo (50:50)					
Mitraginina (MG) Especioginina Especiociliatina Mitraciliatina O-desmetiltramadol (ODT) Tramadol (T)	Sangue <i>Post-mortem</i>		MG: 1.LLE com acetato de etilo após basificação 2.Centrifugação 3.Ressuspensão em 0,05% ácido fórmico/formiato de amônia 10 mM : 0,05% ácido fórmico/acetonitrilo (50:50)	LSD-d ₃ (MG) Ciclizina (ODT; T)	-	-	UPLC-MS/MS (MG) GC-NPD (ODT; T)	[14]
			ODT; T: 1.LLE com acetato de butilo após alcalinização 2. Centrifugação					
Painanteína e seus metabolitos de fase I e II	Urina Humana e de Rato		Metabolitos de fase I: 1.Diluição da urina em água purificada (1:2) seguida de acidificação 2.Hidrólise Enzimática (1,5h; 50 °C) 3. SPE (HCX): eluição com metanol: amoníaco em solução aquosa (98: 2, v/v)	-	Screening		LC-HRMS-MS	[52]
			Metabolitos de fase II: 1.Diluição da urina em água purificada (1:2) 2.SPE (C18): eluição com metanol					
Especioginina e seus metabolitos de fase I e II	Urina Humana e de Rato		Metabolitos de fase I: 1.Diluição da urina em água purificada (1:2) seguida de acidificação 2.Hidrólise enzimática (1,5h; 50 °C) 3. SPE (HCX): eluição com metanol: amoníaco em solução aquosa (98: 2, v/v)	-	Screening		LC-HRMS-MS	[50]
			Metabolitos de fase II: 1.Diluição da urina em água purificada (1:2) 2.SPE (C18): eluição com metanol					
Mitraciliatina Isopainanteína	Urina Humana e de Rato		Metabolitos de fase I: 1.Diluição da urina em água purificada (1:2) seguida de acidificação 2.Hidrólise enzimática (1,5h; 50 °C) 3. SPE (HCX): eluição com metanol: amoníaco em solução aquosa (98: 2)	-	Screening		LC-LIT-MS	[51]
			Metabolitos de fase II: 1.Diluição da urina em água purificada (1:2) 2.SPE (C18): eluição com metanol					

Mitraginina 16-carboximitraginina 9-O-desmetilmitraginina 9-O-desmetil-16-carboximitraginina O-desmetiltramadol (ODT)	Urina Humana e de Rato	1.Hidrólise enzimática (1,5h; 50°C) 2.SPE (HCX): eluição com metanol: solução amoniaco (98:2) 3.Derivatização: Silição com BSTFA:DMF (15:1)	-	0,1 µg/mL (alcalóides) 0,05 µg/mL (ODT)	-	GC-MS	[64]
Mitraginina 5-desmetilmitraginina 17- metildihidromitraginina 7-hidroxitmitraginina	Urina Humana	1.Hidrólise enzimática (3h; 38°C) 2. LLE com éter metil <i>terc</i> -butílico após alcalinização da urina	Mitrafilina	-	0,001 µg/mL (MG)	HPLC-ESI-MS/MS UPLC-ESI-MS/MS	[62]
7-hidroxitmitraginina	Plasma de Rato	1.LLE com clorofórmio 2.Centrifugação (10 min, 10.000 g) 3.Ressuspensão em 0,1% de ácido acético em água e 0,1% de ácido acético em acetonitrilo (10:90; v/v)	Triptolina	0,02 µg/mL	0,01 µg/mL	UPLC-MS/MS	[68]

LLE: extração líquido-líquido; SPE: extração em fase sólida; GC: cromatografia gasosa; LC: cromatografia líquida; HPLC: cromatografia líquida de alta eficiência; UPLC: cromatografia líquida de *ultra-performance*; FID: detector de ionização de chama; MS: espectrometria de massa; MS/MS: espectrometria de massa em *tandem*; DAD: detector de arranjo de díodos; UV: detector ultravioleta; LIT: *linear ion trap*; ESI: sistema de ionização por *electrospray*; NPD: *nitrogen phosphorus detector*; HRMS: espectrometria de massa de alta resolução; MSTFA: N-metil-N (trimetilsilil)trifluoroacetamida; O-TMS: O-trimetilsililado; BSTFA: N,O- bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida; DMF: dimetilformamida

2.4. Farmacocinética

Em vários trabalhos publicados são abordados estudos da farmacocinética da MG, em ratos, após a sua administração oral e intravenosa, estando alguns dos parâmetros farmacocinéticos registados na **Tabela 5** [65-67]. Recentemente, surgiu também um estudo farmacocinético da 7-OHMG após a sua administração intravenosa em ratos, estando os parâmetros farmacocinéticos obtidos registados na **Tabela 5** [68]

Tabela 5: Parâmetros farmacocinéticos da MG e da 7-OHMG obtidos em estudos em ratos.

	Mitraginina				7-hidroxitmitraginina
	Janchawee et al. (2007)	Moraes et al. (2009)	Parthasarathy et al. (2010)		Vuppala et al. (2013)
Método	HPLC-UV	LC-MS/MS	SPE + HPLC-UV		UPLC-MS/MS
Amostras	Soro	Plasma	Plasma		Plasma
Via de Administração	Oral	Oral	Intravenosa	Oral	Intravenosa
Dose Administrada	40 mg/kg	20 mg/kg	1,5 mg/kg	50 mg/kg	4 mg/kg
C_{máx}	0,63 ± 0,18 µg/mL	423,68 ± 61,79 ng/mL	2,3 ± 1,2 µg/mL	0,7 ± 0,21 µg/mL	3,0 ± 0,3 µg/mL
T_{máx}	1,83 ± 1,25 h	1,26 ± 0,20 h	1,2 ± 1,1 h	4,5 ± 3,6 h	-
λ_z	0,07 ± 0,01 h ⁻¹	-	-	-	-
Clearance	1,60 ± 0,58 L/h	6,35 ± 0,43 L/h kg	0,29 ± 0,27 L/h kg	7,0 ± 3,0 L/h kg	44,2 ± 14,8 mL/min/kg
t_{1/2}	9,43 ± 1,74 h	3,85 ± 0,51 h	2,9 ± 2,1 h	6,6 ± 1,3 h	22,9 ± 3,6 min
AUC	6,99 ± 2,93 µg h/mL	188,98 µg min/mL	9,2 ± 6,5 µg h/mL	8,2 ± 3,0 µg h/mL	98,3 ± 32,1 µg min/mL
V_d	89,5 ± 30,30 L/kg	37,90 ± 5,41 L/kg	0,79 ± 0,42 L/kg	64 ± 23 L/kg	1595,8 ± 586,3 mL/kg
Biodisponibilidade	-	-	-	3,03 ± 1,47 %	-

C_{máx}: Concentração máxima; T_{máx}: Tempo Máximo (Tempo ao fim do qual se atinge C_{máx}); λ_z: Constante de eliminação; t_{1/2}: Tempo de semi-vida; AUC: Área sobre a curva; V_d: Volume de distribuição

2.4.1. Absorção

Segundo Janchawee et al. (2007) e Moraes et al. (2009), a MG é rapidamente absorvida após a sua administração oral em ratos [65, 66]. Pelo contrário, Parthasarathy et al. (2010) concluíram, também em ratos, que esta absorção foi lenta e prolongada com um $T_{m\acute{a}x}$ de 4,5 horas, e até parcial visto o reduzido valor calculado de biodisponibilidade oral da MG (3,03%). Devido às discrepâncias observadas nos parâmetros farmacocinéticos, estes últimos autores justificam a sua conclusão com reduzida biodisponibilidade oral da MG obtida, provocada de facto pela sua fraca absorção [67]. Contudo, até à data, existem poucos métodos estabelecidos para a identificação e determinação de MG em soro e plasma, o que dificulta a obtenção de dados concretos referentes à sua farmacocinética.

2.4.2. Distribuição

Na administração intravenosa de MG em ratos, a sua eliminação bifásica e natureza lipofílica sugeriam que esta se distribuisse pelos compartimentos periféricos. Porém, o seu volume de distribuição é relativamente pequeno (0,79 L/Kg) indicando que o alcalóide não é amplamente distribuído pelos compartimentos periféricos [67]. No estudo farmacocinético da 7-OHMG, o rápido decréscimo da sua concentração no plasma indica que este alcalóide rapidamente se distribui pelos tecidos, dada a sua natureza lipofílica ser superior à da MG, segundo os autores, contudo o seu volume de distribuição é apenas ligeiramente superior a este último (1595,8 mL/Kg). Por esta razão, Vuppala et al. (2013) propõem que esta sua rápida eliminação poderá dever-se principalmente ao elevado valor de *clearance* obtido no estudo (44,2 mL/min/kg) e à ausência da sua distribuição pelos tecidos [68].

2.4.3. Metabolismo

O início do estudo do metabolismo da MG remota a 1967, onde Beckett et al. (1967) propuseram uma via metabólica em que este alcalóide era O-desmetilado no grupo metoxilo, na posição C17 [72]. Mais tarde, Macko et al. (1972) sugeriram que esta fosse metabolizada ao seu análogo 7-OHMG ou a outro composto quimicamente mais ativo [21]. Atualmente, Philipp et al. (2009) e Maurer et al. (2010) propuseram um mecanismo metabólico da MG, onde foram identificados sete metabolitos de Fase I, a partir da hidrólise do metiléster, na posição C16 (3,4 – **Figura 7**) e da O-desmetilação no grupo metoxilo em C9 (2,4,6,8 – **Figura 7**) e C17 (5,8 – **Figura 7**), via intermediários

aldeídos, seguida da oxidação a ácidos carboxílicos (7,8 – **Figura 7**), redução a álcoois (5,6 – **Figura 7**) ou a combinação destas duas vias (4,6,8 – **Figura 7**). No entanto, apesar da MG ser extensivamente metabolizada em humanos e ratos, a nível do metabolismo de Fase II existem algumas diferenças. Nos ratos, os autores identificaram quatro metabolitos conjugados com ácido glucurónico (2G, 3G, 4G, 6G – **Figura 7**) e apenas um com sulfatos (4S – **Figura 7**), enquanto nos humanos foram encontrados três metabolitos glucuronídeos (2G, 3G, 5G – **Figura 7**) e outros três sulfatados (2S, 4S, 6S – **Figura 7**) [73, 74].

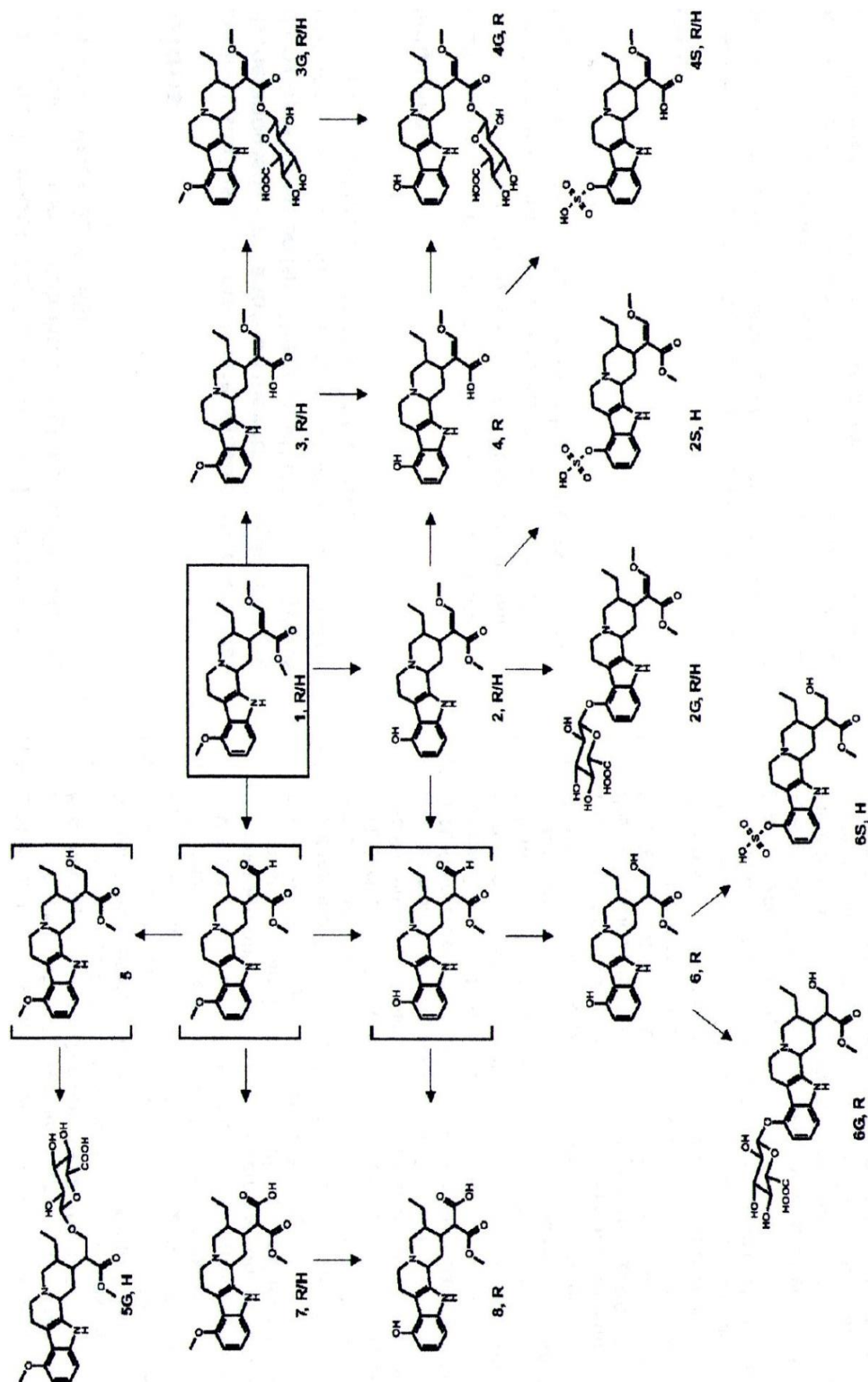


Figura 8: Vias metabólicas da MG em ratos (R) e humanos (H). Adaptado de Philipp et al. (2009).

Noutro estudo mais recente, foi também proposto o mecanismo de metabolização de diastereoisómeros da MG e da PAY, como a mitraciliatina e a isopainanteína, pois estes metabolitos foram identificados em urina de consumidores de *Kratom* [51].

Para a avaliação do metabolismo de Fase I do *Kratom* pelo conjunto de isoenzimas do sistema do Citocromo P450 (CYP450), um dos maiores complexos enzimáticos responsável pela metabolização de fármacos e substâncias tóxicas, Hanapi et al. (2010) estudaram a inibição enzimática das CYP2D6, CYP3A4 e CYP2C9 provocada pelo extrato metanólico de *Mitragyna speciosa*, *in vitro*. Os autores observaram 90% de inibição enzimática da CYP2D6 e 80% da CYP3A4 pela *Mitragyna speciosa*, com valores de IC_{50} de $3,6 \pm 0,1 \mu\text{g/mL}$, estando este valor na mesma gama de concentrações do fármaco inibidor da CYP2D6, a quinidina ($1,09 \pm 0,36 \mu\text{g/mL}$). Este facto, permite chamar a atenção para o consumo desta planta juntamente com fármacos que dependam destas enzimas para o seu metabolismo. Contudo, os constituintes da planta responsáveis por esta potente inibição ainda são desconhecidos [75]. Mais recentemente, Lim et al. (2012) estudaram os efeitos da MG nas isoenzimas CYP1A2, CYP2D6 e CYP3A4 pela expressão de mRNAs que as codificam, como também a expressão da proteína e a atividade enzimática resultante. Estes autores verificaram que a MG induziu a expressão de mRNA e de proteínas da CYP1A2 pois, na concentração mais elevada de MG ($25 \mu\text{M}$), observaram a indução de 70% da atividade enzimática, significando que a MG é um indutor significativo da CYP1A2, *in vitro*. Pelo contrário, para a isoforma CYP3A4, a MG mostrou ser um fraco inibidor da sua transcrição, como também da própria atividade da enzima, representando a improbabilidade desta possuir efeitos significativos sobre a atividade da CYP3A4 [76].

2.4.4. Excreção

Janchawee et al. (2007), através do $t_{1/2}$ calculado para a administração oral de MG, sugeriram que a sua eliminação fosse lenta [65]. Contudo, em estudos mais recentes, foram obtidos tempos de semi-vida inferiores, sendo necessário uma maior exploração deste parâmetro farmacocinético [66, 67]. Quanto à eliminação da 7-OHMG, foi obtido um $t_{1/2}$ semelhante aos estudos mais recentes da farmacocinética da MG, o que sugeria que também a sua eliminação fosse lenta. No entanto, com o rápido decréscimo da sua concentração plasmática, pode aferir-se que a sua eliminação é rápida e poderá estar relacionada diretamente com o elevado valor de *clearance* obtido ($44,2 \text{ mL/min/Kg}$) [68].

2.5. Efeitos Fisiológicos

Os estudos farmacológicos predominantes acerca destes alcalóides centram-se principalmente na sua atividade antinociceptiva, pela sua acção nos recetores opióides e/ou nos sistemas noradrenérgico e serotoninérgico pelo bloqueio dos canais de cálcio [17]. Quanto à MG, os seus efeitos chegam a ser clinicamente semelhantes à codeína, um fármaco do grupo dos opióides usado no tratamento da dor moderada e como antitússico, pois este alcalóide do *Kratom* tem as mesmas propriedades antitússica, antinociceptiva e antidiarreica [77, 78]. Entre os consumidores desta droga têm sido usualmente descritos alguns sintomas de náuseas, vômitos e diarreia enquanto, em uso crónico, têm sido verificados casos de anorexia e perda de peso pela inibição da produção do suco gástrico, como também psicose e hiperpigmentação da pele [77, 79]. No entanto, os seus efeitos dependem da dose consumida visto que ela atua como estimulante em doses baixas, mas como opióide e depressor do SNC em doses mais elevadas [7, 78, 79]. Estes efeitos foram observados quer em humanos, quer em modelo animal, contudo as doses necessárias para produzir a estimulação, a analgesia ou toxicidade permanecem ainda mal definidas [11, 21, 78, 79].

2.5.1. Efeitos Antinociceptivos

Os opióides exercem o seu efeito através de um sistema de recetores do SNC altamente seletivo: os recetores opióides *mu* (μ), *kapa* (κ) e *delta* (δ) pertencentes à família de recetores acoplados à proteína G. Os recetores μ estão localizados a nível da medula e do encéfalo provocando, a sua ativação, um efeito analgésico muito potente a nível supraespinal, sendo estes os principais responsáveis pela causa da dependência física e da depressão respiratória causada pelos opióides. Por outro lado, a ação sobre os recetores κ provoca essencialmente as alucinações e a analgesia espinal. Os recetores δ são recetores minoritariamente ativados e por isso com menos importância a nível da analgesia, sendo apenas responsáveis por alterações do comportamento afetivo [80-82]. Quando um opióide se liga ao seu recetor, a proteína G associada torna-se ativa. Deste modo, a ativação do recetor diminui a atividade da adenilil ciclase, resultando na diminuição da produção de adenosina monofosfato cíclico (cAMP). Consequentemente, há um aumento de efluxo de K^+ e hiperpolarização celular, acompanhado de uma diminuição do influxo de Ca^{2+} provocando baixas concentrações de Ca^{2+} livre intracelular. Desta forma, a diminuição da libertação de neurotransmissores resulta em analgesia, proporcionando a ação antinociceptiva dos opióides nos locais supraespinais, espinais e periféricos [82, 83].

Para a avaliação dos potenciais efeitos antinociceptivos provocados pelo *Kratom*, vários estudos avaliaram a sua atividade agonista opióide produzida a partir de extratos da *Mitragyna speciosa* ou pelos alcalóides presentes na planta. Em todos os estudos, tanto os extratos como os alcalóides, apresentaram uma potente atividade analgésica mediada pelo sistema de recetores opióides, visto que a antinocicepção foi revertida pela naloxona, um antagonista não seletivo dos recetores opióides [29, 30, 84-88]. Contudo, os resultados obtidos quanto ao subtipo de recetores opióides ativados são contraditórios [17]. A maioria dos trabalhos desenvolvidos revela que a MG tem uma maior afinidade para os recetores opióides μ e δ , sendo estes responsáveis pela sua elevada atividade analgésica, assim como pela melhoria dos sintomas de abstinência de opiáceos, sendo que a analgesia poderá estar relacionada com a sua estrutura química, nomeadamente no grupo metoxilo presente na posição C9 e ao átomo de N do anel C (**Figura 3**) [11, 19, 88-91].

Para além do estudo da antinocicepção mediada pelos recetores opióides, Shamima et al. (2012) estudaram este efeito da MG também nos recetores canabinóides do tipo 1 (CB1) devido a estes recetores estarem envolvidos no tratamento da dor e pela possibilidade da formação de complexos homodiméricos e/ou heterodiméricos com os recetores opióides μ e/ou com os recetores de dopamina D2 [92-95]. No entanto, esta atividade antinociceptiva parece ser apenas mediada pelos recetores opióides, principalmente pelos subtipos κ e δ , pois esta apenas foi bloqueada significativamente pela naloxona, naltrindole (antagonista dos recetores opióides δ) e norbinaltorpimina (antagonista dos recetores opióides κ). Este efeito não foi antagonizado pelo AM251, um antagonista dos CB1, o que significa que não existe qualquer envolvimento direto destes recetores canabinóides na ação antinociceptiva da MG [95].

Quanto aos efeitos antinociceptivos dos extratos da *Mitragyna speciosa*, vários autores observaram que estes dependem do tipo de compostos extraídos pelos diferentes solventes usados na extração [85-87]. Além disso, esta ação ainda pode ser potenciada pela coadministração de cafeína, codeína e paracetamol [84, 96].

Nos estudos com os alcalóides presentes no *Kratom*, alguns autores compararam a ação antinociceptiva da MG e dos seus derivados oxidativos: a 7-OHMG e a mitraginina pseudoindoxilo (**Figura 9**). Nestes estudos, os seus derivados oxidativos apresentaram uma potente atividade agonista dos recetores opióides, superior à própria mitraginina pois possuem uma maior afinidade para os recetores μ e δ [88, 91, 97].

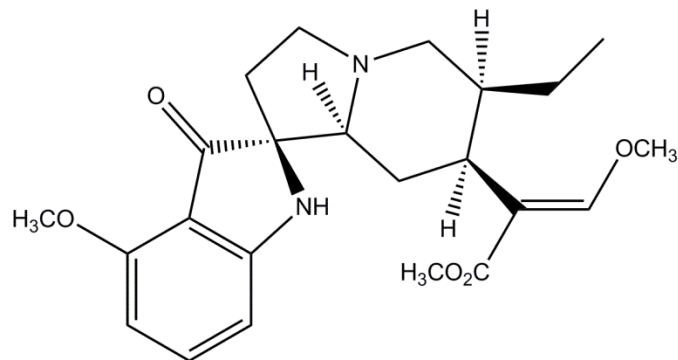


Figura 9: Estrutura de um derivado oxidativo da MG: Mitragnina Pseudoindoxilo

Matsumoto et al. (1996,2005) e Watanabe et al. (1997) ainda foram mais longe comparando a acção antinociceptiva do alcalóide maioritário do *Kratom* não só com a 7-OHMG mas também com a morfina. Estes autores observaram que a MG é 13 vezes mais potente que a morfina, sendo que a 7-OHMG é cerca de 46 vezes mais potente que a MG [98-100]. Mais tarde, Matsumoto et al. (2006) encontraram também uma atividade antinociceptiva superior para a 7-OHMG do que para a morfina, embora os mecanismos responsáveis pela elevada potência da 7-OHMG ainda sejam desconhecidos [42]. Alguns autores descreveram este alcalóide como sendo mais lipófilo, penetrando mais facilmente na barreira hemato-encefálica (BHE), mas outros descrevem-no como menos lipófilo do que a MG, pois a presença de um grupo hidroxilo nesta molécula torna-a mais polar e difícil de penetrar na BHE em relação à MG [19, 42]. No estudo de Takayama et al. (2004), os recetores opióides responsáveis pela ação antinociceptiva da 7-hidroxitraginina são os recetores opióides μ_1 . Pelo contrário, no estudo de Matsumoto et al. (2005, 2006), os recetores opióides supraespinais δ e κ são os recetores envolvidos [19, 30, 42]. Vários autores reportaram que a ação antinociceptiva da 7-OHMG mediada pela ativação de recetores opióides μ é muito superior à induzida pela morfina [30, 42, 43, 97, 99]. Ainda relacionando os efeitos antinociceptivos da MG com os da morfina, Fakurazi et al. (2013) demonstraram uma melhoria da ação analgésica pela MG quando esta é coadministrada com a morfina, em tratamento prolongado, além desta combinação também diminuir o desenvolvimento de tolerância à morfina. Envolvido neste mecanismo de redução da tolerância pela coadministração das duas substâncias, está a regulação negativa da via do cAMP visto que há um aumento significativo dos níveis de cAMP e da proteína da ligação ao elemento-resposta cAMP (CREB) com a administração de morfina, mas não com a administração da combinação. No entanto, neste estudo, os tratamentos de combinação induziram alguns efeitos secundários, nomeadamente alterações de parâmetros toxicológicos no fígado e rins, sugerindo uma pesquisa mais profunda sobre as propriedades biológicas do tratamento

de combinação entre a MG e a morfina com a determinação do seu mecanismo de ação específico [101].

Além dos efeitos antinociceptivos da MG mediados pelo sistema de recetores opióides, alguns autores descrevem também o envolvimento dos sistemas serotoninérgico e noradrenérgico [17, 99, 102]. Estas conclusões são corroboradas por estudos recentes que demonstraram a inibição da libertação de neurotransmissores das terminações nervosas dos vasos deferentes na presença de MG, através do bloqueio de canais de Ca^{2+} , conduzindo à inibição da transdução da dor, contribuindo para a sua ação analgésica [17, 99]. Além disso, Kumarnsit et al. (2007) descreveram um dos locais de ação da MG localizado no SNC, o núcleo dorsal do rafe, uma grande área serotoninérgica do cérebro, onde vários medicamentos/drogas podem interferir desde que atuem nos subtipos de recetores opióides por vias serotoninérgicas [103].

2.5.2. Efeitos Neurofisiológicos

Desde muito cedo, em 1932, os investigadores tentaram perceber o mecanismo de ação desta droga no sistema nervoso. Grewal et al. (1932) descreveram dois modos de ação da MG, quer a nível do Sistema Nervoso Autónomo (SNA), quer a nível do SNC. No SNA, os efeitos deste alcalóide passam pela facilitação da passagem de impulsos afetando as divisões craniossacral e simpática, enquanto no SNC a sua ação passa pela excitação da medula, provavelmente nos centros motores [79].

Mais recentemente, Farah Idayu et al. (2011) observaram o efeito antidepressor da MG pela sua interação com o sistema neuroendócrino do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA): os níveis de corticosterona, uma hormona libertada em situações de *stress* controlada pelo eixo HPA, nos ratos expostos ao alcalóide, reduziram significativamente [104].

Além destes efeitos neurofisiológicos, também foi demonstrada alteração na função cognitiva comportamental em ratos, pela administração de MG e de extratos de *Mitragyna speciosa* [105]. Contudo, em outras funções cognitivas como a aprendizagem e a memória, vários estudos mostraram ambiguidade. Alguns autores não observaram nenhum efeito significativo sobre estas funções, mas Senik et al. (2012) observaram uma melhoria significativa destas funções [105-108]. Estas discrepâncias poderão estar relacionadas com a transmissão sináptica e a plasticidade, contudo é necessário uma investigação mais profunda sobre este tema visto que os estudos sobre estes efeitos neurofisiológicos são ainda escassos [20].

2.5.3. Efeitos Anti-inflamatórios

Em alguns estudos *in vivo*, são demonstrados os efeitos anti-inflamatórios dos extratos de *Mitragyna speciosa* podendo estes serem provocados quer pela inibição da libertação de mediadores pró-inflamatórios, quer pelo aumento da permeabilidade vascular em combinação com a imunidade reforçada, ou pela estimulação da reparação tecidual e processos de cicatrização [87, 109].

Quanto ao mecanismo celular envolvido nas propriedades anti-inflamatórias da droga, este foi estudado a partir do seu constituinte maioritário, a MG. Desta forma, Utar et al. (2011) avaliaram os efeitos da MG na expressão de mRNA e da proteína COX-1 e COX-2, isoformas da cicloxigenase envolvidas na via inflamatória que catalisa a formação de prostaglandina E2 (PGE2), um dos mediadores inflamatórios mais fortes importantes numa linha celular específica de macrófagos. Neste estudo recente, os autores observaram uma supressão da produção de PGE2 por inibição da COX-2, dependendo da concentração de MG utilizada [110].

A ação anti-inflamatória do *Kratom* também compreende os seus efeitos antibacterianos para o tratamento de infeções intestinais, estando estes diretamente relacionados às suas propriedades antioxidantes. Desta forma, em vários estudos *in vivo* foi observada a potente ação antioxidante de extratos metanólicos, aquosos e de alcalóides da planta com o aumento da atividade específica da glutathione S-transferase (GST), uma enzima capaz de catalisar a reação de conjugação da glutathione e compostos eletrófilos, estando envolvida na eliminação de compostos tóxicos, logo na proteção dos organismos contra lesões graves [111, 112].

2.5.4. Efeitos Gastrointestinais

Como entre os consumidores de *Kratom* têm sido relatados alguns sintomas gastrointestinais, como náuseas, diarreia e vômitos, além da anorexia e perda de peso observadas em utilizações crónicas, vários estudos investigaram estas possíveis ações da *Mitragyna speciosa*. Kumarnsit et al. (2006) verificaram uma supressão da ingestão de água e alimentos, como também uma redução do ganho do peso nos ratos com a administração aguda e crónica de extratos da planta [113].

Por outro lado, o *Kratom* é muito usado na Tailândia para tratar a diarreia na medicina tradicional, embora não exista nenhuma evidência científica para suportar esta ação terapêutica. Neste sentido, em alguns estudos *in vivo* observou-se um efeito

antidiarreico induzido pela administração de extratos da planta e/ou pela 7-OHMG [42, 114]. Chittrakan et al. (2008) observaram este efeito na administração aguda de ambos, dependente da concentração, contudo este efeito não foi mediado pelos recetores opióides uma vez que não houve uma reversão do efeito pela naloxona. No entanto, com este tratamento crónico, não foram observadas quaisquer tipos de alterações no trato gastrointestinal, indicando que talvez tivesse ocorrido uma adaptação do organismo. Além disso, foi verificado que o *Kratom* não contribui para a anorexia relatada pelos consumidores dado que o nível plasmático de colecistoquinina (CCK), uma hormona associada à supressão do apetite, não foi afetado [114].

Para além das propriedades antidiarreicas e da perda de peso e apetite associadas ao consumo da droga, também foram observados, num estudo *in vitro*, os potenciais efeitos antidiabéticos devido ao aumento da taxa de captação da glucose e dos níveis de proteínas transportadoras da glucose por extratos da planta [115].

Quanto à influência da MG na secreção do suco gástrico, visto que os recetores opióides no SNC parecem ser os responsáveis pela sua regulação, Tsuchya et al. (2002) observaram que existe de facto uma inibição da sua secreção pela estimulação da 2-desoxi-D-glucose. Além disso, este mecanismo foi revertido pela naloxona, comprovando mais uma vez que o sistema de recetores opióides está envolvido neste processo. Neste mesmo estudo, notando que a inibição da secreção do suco gástrico pode estar relacionada com a anorexia e a perda de peso, concluiu-se que este mecanismo está associado a uma inibição direta dos neurónios do hipotálamo lateral [116].

2.5.5. Outros Efeitos Fisiológicos

Para além dos efeitos antinociceptivos, neurofisiológicos, anti-inflamatórios e gastrointestinais provocados pelo *Kratom*, também os seus extratos detiveram influência ao nível da pressão sanguínea, na junção neuromuscular e no potencial de ação composto do nervo somático de ratos. Harizal et al. (2010) observou um aumento da pressão sanguínea em ratos, após a administração de extratos metanólicos de *Mitragyna speciosa* [117]. Chittrakan et al. (2010) verificaram um relaxamento muscular nos ratos, tendo os extratos um maior efeito na junção neuromuscular do que no músculo-esquelético ou no nervo somático. Tanto a administração do extrato da planta, como a da MG, bloquearam a condução nervosa e a duração do potencial de ação composto do nervo [118].

Outros efeitos, provocados pela *Mitragyna speciosa*, estão intimamente relacionados com a coadministração de medicamentos ou outras drogas com esta planta porque, tal como referido anteriormente, esta droga inibe algumas isoenzimas do complexo enzimático CYP450, sendo esta inibição mais pronunciada na CYP2D6 e CYP3A4 [75]. Desta forma, se outro composto metabolizado por estas enzimas for administrado simultaneamente com o *Kratom*, estando estas inibidas, o efeito do medicamento/droga administrada será bastante diferente do esperado.

2.6. Toxicologia

Apesar de existirem vários estudos, quer *in vivo*, quer *in vitro*, e relatos de casos de estudo sobre a toxicidade do *Kratom*, as doses necessárias para produzir os efeitos estimulantes, analgésicos ou a sua toxicidade ainda não se encontram bem definidas, assim como as substâncias responsáveis por estes efeitos [20]. Por esta razão, é extremamente importante que se efetue mais estudos neste sentido.

2.6.1. Estudos *in vivo*

2.6.1.1. Casos de Estudo em Humanos

Para fornecer informações sobre os efeitos do *Kratom* em humanos, de forma a uma melhor compreensão dos seus mecanismos de toxicidade, estão reportados na literatura vários casos de intoxicações agudas e crónicas, toxicidade por interação com outras drogas usadas com fins recreativos, tratamento de indivíduos dependentes e mortes acidentais associadas a esta droga, entre outros.

Nos casos de intoxicações a longo prazo estão descritos 3 casos clínicos, onde os indivíduos, consumidores regulares de *Kratom*, foram encontrados com convulsões, icterícia visível, prurido intenso, apatia e/ou face mixedematosa. Em todos estes casos foram recolhidas amostras de urina e sangue dos consumidores, onde foi detetada MG em todas elas, mas não a presença de outros análogos ou adulterantes [54, 119, 120]. No caso descrito por Sheleg and Collins (2011), o indivíduo *Kratom-dependente* e também alcoólico, chegou mesmo a desenvolver sintomas de abstinência e um grave hipotireoidismo primário, existindo uma relação implícita entre o consumo desta droga e a disfunção da tiróide [120]. Segundo Meites et al. (1979), Rauhala et al. (1998) e Ogrin et al. (2005), a secreção da hormona estimulante da tiróide (TSH) é suprimida pela morfina em modelos animais e doentes stressados [121-123]. Por este motivo, possivelmente

também uma elevada dose de MG pode reduzir a atividade da glândula da tiróide e resultar num desequilíbrio da TSH [20]. Contudo, este facto ainda não foi confirmado devido à ausência de outros casos idênticos.

Com uma sintomatologia semelhante aos casos de intoxicação a longo prazo, Nelsen et al. (2010) descreveram o único caso de intoxicação aguda da literatura de um indivíduo que foi encontrado em casa com convulsões, pouco tempo depois do consumo de *Kratom*. Mais tarde, após a chegada à unidade hospitalar, encontrava-se também apático. Na urina foi encontrada uma concentração de MG de 167 ± 15 ng/mL. Os autores sugeriram que a estimulação purinérgica, adrenérgica ou serotoninérgica seja responsável pelas convulsões observadas, de uma forma similar ao mecanismo do tramadol [124].

Para o auto-tratamento da dor crónica e da abstinência aos opióides, um indivíduo apresentou também convulsões tónico-clónicas após a administração da droga, sendo que na paragem do tratamento, se verificou um período de abstinência menos intenso mas mais prolongado do que no consumo de opióides. Com este caso, os autores corroboraram que a MG se liga aos recetores opióides μ e κ , embora possa ter afinidade com outros recetores que possam aumentar a sua eficácia na atenuação da abstinência aos opióides [16].

Nas intoxicações por consumo de misturas, foram relatados dois casos de estudo que levaram à morte de vários indivíduos. Holler et al. (2011) descreveram um caso de abuso de MG e da propilhexedrina, uma amina simpaticomimética com ação α -adrenérgica potente, presente nos inaladores descongestionantes nasais. Na análise *post-mortem* do sangue encontrou-se uma concentração de propilhexedrina de 1,7 mg/L e de MG de 0,39 mg/L, sendo que na urina foram detetados propilhexedrina, mitraginina, paracetamol, morfina e prometazina. Embora o indivíduo tenha abusado das duas substâncias, a causa de morte referenciada foi apenas da toxicidade pela propilhexedrina visto que não existem dados publicados sobre as concentrações tóxicas de MG, não se podendo conhecer o seu contributo para esta morte [55]. Com o consumo de *Krypton*, uma mistura dos extratos de *Mitragyna speciosa* com o O-desmetiltramadol, metabolito ativo do analgésico tramadol e também agonista dos recetores opióides, Kronstrand et al. (2011) descreveram 9 casos mortais, num período inferior a um ano. Foram recolhidas amostras de sangue e urina *post-mortem*, onde as concentrações plasmáticas de MG encontradas foram de 0,02 a 0,18 μ g/g e de O-desmetiltramadol de 0,4 a 4,3 μ g/g. Nestas amostras não foram identificados tramadol, nem N-desmetiltramadol, significando que a droga ingerida pelos indivíduos continha mesmo O-

desmetiltramadol. Os autores concluíram que o O-desmetiltramadol contribuiu para a morte não intencional dos casos apresentados visto que este é um potente agonista dos recetores opióides μ [14].

A desintoxicação de um individuo dependente de *Kratom* foi retratada por McWhirter et al. (2010) onde um individuo alcoólico com transtorno de ansiedade, apresentou sintomas de abstinência (ansiedade, agitação, tremores, sudorese) após o seu consumo durante um ano. Para o tratamento dos fenómenos de abstinência o paciente foi sujeito a um regime de redução de dihidrocodeína e lofexidina, mostrando-se esta medicação eficaz no apoio à desintoxicação [125].

Na Malásia e na Tailândia, de onde o *Kratom* é proveniente e consumido regularmente, existem dois estudos sobre a sua dependência e a síndrome de abstinência relacionada em consumidores crónicos e/ou que foram hospitalizados por intoxicações por esta droga. Singh et al. (2014) estudaram 293 consumidores na Malásia, durante o período de um ano, e verificaram que 45% dos consumidores desenvolveram dependência moderada com sintomas físicos (espasmos musculares, dor, dificuldades em adormecer, afrontamentos, febre, diminuição do apetite, diarreia) e psíquicos (inquietação, tensão, ansiedade, tristeza, nervosismo). Neste estudo, em média, a dose diária consumida de MG era de 276,5 mg em bebidas de *Kratom*, sendo este consumo justificado pelo aumento da energia física dos consumidores, por curiosidade e influência de outros, por substituição do álcool e outras drogas ilícitas ou para ajuda em problema de saúde, como os diabetes [126]. Trakulsrichai et al. (2013) relataram um caso clínico envolvendo 52 consumidores da Tailândia, chegados à unidade hospitalar ao longo de 5 anos. Destes, a 76,9% foi-lhes diagnosticada intoxicação pelo *Kratom* com uma sintomatologia de palpitações e convulsões, 23,1% sofriam de síndrome de abstinência, revelando insónias, cansaço, desconforto no peito e dores musculares. Na maioria dos doentes intoxicados, verificou-se que eram consumidas muitas outras substâncias para além do *Kratom*. Nos intoxicados, o mecanismo de ação das convulsões não foi esclarecido e os sintomas de sedação e/ou depressão do SNC não foram registados, o que significa que as doses ingeridas de *Kratom* não foram suficientemente elevadas. Ainda neste estudo, foi revelado o internamento de um bebé com sintomas de abstinência devido à sua mãe ser consumidora de *Kratom* durante a gravidez, o que indica que esta droga possa transpôr a barreira placentária [127]. Em nenhum dos estudos foram registadas mortes.

2.6.1.2. Estudos em animais

Nos estudos em modelos animais, a toxicidade da MG revelou-se relativamente baixa. Macko et al. (1972) efetuaram um estudo em cães onde não encontraram evidências de toxicidade, embora alguns animais apresentassem alguns sintomas, como tremores e convulsões, para as doses mais elevadas (920 mg/kg) [21]. Contudo, mais recentemente, Janchawee et al. (2007) relataram efeitos letais em roedores após administração oral de 200 mg/kg de MG [65]. Estes resultados foram corroborados pelo trabalho de Azizi et al. (2010), com a administração oral de uma dose de 200 mg/kg de extratos de *Mitragyna speciosa* [111].

Outros estudos efetuados para a avaliação de parâmetros associados à toxicidade de extratos de *Mitragyna speciosa* foram apresentados por Reanmongkol et al. (2007), onde o teste de toxicidade aguda efetuado em ratinhos revelou valores de LD₅₀ de 4,90 g/kg e 173 mg/kg na administração oral de extratos metanólicos e purificados de alcalóides, respetivamente. Neste teste, os sinais de toxicidade apresentados incluíram letargia, tremores, paralisia, perda de reflexos de endireitamento, apneia, convulsões tónico-clónicas e a morte [85]. Harizal et al. (2010) investigaram, também em ratos, a toxicidade aguda associada à administração oral de extratos metanólicos da planta (100, 500 e 1000 mg/kg), contudo não encontraram alterações no comportamento, no peso corporal, no consumo de água e alimentos, e nos parâmetros hematológicos. No entanto, na avaliação dos parâmetros bioquímicos, a ingestão destes extratos provocou um aumento significativo da alanina transaminase (ALT) e da argininosuccinato liase (ASL), da albumina, dos triglicéridos e do colesterol. Quanto à nefrotoxicidade, esta foi apenas observada na dose mais elevada administrada (1000 mg/kg), indicado por um elevado valor de creatinina. Os resultados do exame histológico, em células do fígado, mostraram congestão dos sinusóides, hemorragia nos hepatócitos, degeneração gordurosa, necrose centrilobular e um aumento do número de células de Kupffer, significando que a *Mitragyna speciosa* induziu uma severa hepatotoxicidade. Quanto às alterações a nível neurológico, não foram observados danos nos axónios e dendrites nos neurónios do hipocampo. Visto que este estudo incluiu apenas a avaliação da toxicidade aguda dos extratos de *Mitragyna speciosa*, os autores sugeriram a realização de estudos sobre a investigação da toxicidade crónica associada a esta droga [117].

2.6.2. Estudos *in vitro*

Em 2007, começaram a surgir estudos *in vitro* para a avaliação da toxicidade da *Mitragyna speciosa* e do seu alcalóide maioritário, a MG. Saidin and Gooderham (2007) começaram por estudar a citotoxicidade da *Mitragyna speciosa* em linhas celulares humanas linfoblásticas (cHol, MCL-5), renais (HEK 293) e neuronais (SH-SY5Y), com ensaios de proliferação celular, de clonogenicidade e análise por citometria de fluxo, onde a citotoxicidade foi realmente verificada em todas as linhas celulares, sendo esta dependente da concentração. Os extratos da planta provocaram uma inibição da proliferação celular em todas as linhas celulares a partir da concentração de 100 µg/mL, com morte celular significativa aos 1000 µg/mL. Na avaliação da toxicidade crónica nas linhas HEK 293 e SH-SY5Y com os ensaios de clonogenicidade não se verificou a formação de colónias a partir da concentração de 500 µg/mL. Com o estudo do ciclo celular nas células MCL-5 e SH-SY5Y, após 48 h de exposição aos extratos (50, 100, 250, 500 µg/mL), através da citometria de fluxo, os autores verificaram uma paragem do ciclo celular na fase G1 a partir dos 100 µg/mL e na fase G1/S a partir dos 500 µg/mL [128]. Mais tarde, Saidin et al. (2008) continuaram a investigação da citotoxicidade provocada pela *Mitragyna speciosa*, mas desta vez acompanhada por danos no DNA, em linhas celulares neuronais humanas (SH-SY5Y) e usando o *Mouse Lymphoma tk Gene Mutation Assay*¹ (MLA). Além disso, estudaram ainda o efeito da ativação metabólica na toxicidade do extrato de *Mitragyna speciosa* em células linfoblásticas MCL-5 (metabolicamente competentes) e cHol (metabolicamente incompetentes), bem como a toxicidade da MG. Os extratos da planta e a MG revelaram ser citotóxicos para as células neuronais humanas *in vitro*, podendo esta toxicidade ser revertida com naxolona. Contudo não foi observada genotoxicidade no teste MLA. Quanto à incubação dos extratos nas células MCL-5 e cHol, a planta mostrou ser mais citotóxica nas células MCL-5 do que nas cHol, devido à ausência de metabolização dos extratos nesta última. Na ativação metabólica da MG e dos extratos, os autores estudaram inibidores metabólicos que indicaram o aumento da toxicidade quer do alcalóide, quer da planta, por diminuição da atividade da CYP2E1 [129].

Moklas et al. (2008), também para avaliaram a atividade citotóxica de extratos de *Mitragyna speciosa* e da MG pelo teste de letalidade com artémias salinas². Os autores

¹ **Mouse Lymphoma tk Gene Mutation Assay:** avaliação da citotoxicidade e mutagenicidade a partir da deteção de mutações no locus da timidina-cinase.

² **Teste de letalidade com artémias salinas:** avaliação da citotoxicidade, a partir da sua exposição aos agentes citotóxicos, após a incubação dos seus ovos, pelo cálculo da taxa de mortalidade das artémias recorrendo à observação microscópica e cálculo dos respetivos valores de LC₅₀.

analisaram os parâmetros de toxicidade aguda da MG e de extratos aquosos e alcalóides da planta, onde foram verificados valores de LC_{50} de 44 $\mu\text{L/mL}$, 62 $\mu\text{L/mL}$ e 98 $\mu\text{L/mL}$, respetivamente. Deste modo, os autores concluíram que a MG apresenta uma maior toxicidade do que os extratos da planta, sendo que o extrato aquoso é mais tóxico que o extrato purificado de alcalóides [130].

Para a investigação da potencial atividade mutagénica ou antimutagénica de extratos aquosos de *Mitragyna speciosa* surgiu o estudo de Ghazali et al. (2011). Estes autores utilizaram o teste de Ames³, na presença e ausência de sistemas ativadores metabólicos S9 para esta avaliação, donde se concluiu não resultar qualquer atividade mutagénica provocada pelos extratos. Pelo contrário, a *Mitragyna speciosa* revelou conter propriedades antimutagénicas na presença do sistema ativador metabólico S9 [131].

Além da necessidade de estudo da toxicidade crónica da *Mitragyna speciosa*, também seria importante, no futuro próximo, o estudo *in vivo* e *in vitro* dos parâmetros de toxicidade aguda e crónica associados às amostras de *Kratom* que são vendidas nas *smartshops* ou pela Internet porque são estas as mais consumidas, sendo que, até à data, não existe qualquer tipo de trabalho científico neste sentido.

³ **Teste de Ames:** avaliação da mutagenicidade a partir de mutações em *loci* específico nas bactérias *Salmonella typhimurium* responsáveis pela biossíntese da histidina. Quando os mutantes são expostos a um agente mutagénico, o genótipo da histidina é revertido permitindo às células bacterianas proliferar e formar colónias.

Parte II

Objetivos e Âmbito da Dissertação

Nestes últimos anos, o aparecimento no mercado de NPS, não controladas pela legislação vigente, tem sido uma grande preocupação para as autoridades competentes devido à falta de segurança que apresentam para os consumidores quer pelo desconhecimento da sua composição, como também da sua ação farmacológica. Nestas NPS, está incluído o *Kratom* - uma droga proveniente da planta *Mitragyna speciosa* com ação estimulante e também sedativa. Durante vários anos, o *Kratom* foi uma droga consumida maioritariamente no sudeste da Ásia, principalmente na Malásia e na Tailândia, mas nos últimos anos, tornou-se muito popular no mercado das drogas recreativas a nível mundial, verificando-se ser a *legal high* mais procurada na Internet, tendo a sua disponibilidade vindo a aumentar cada vez mais. Além do uso recreativo, esta também é procurada para o auto-tratamento dos sintomas de abstinência dos consumidores de opióides. Apesar de já existir algum controlo da sua comercialização em vários Estados-Membros da União Europeia, e nos países de origem, o *Kratom* continua facilmente acessível através da Internet, visto que este sempre foi a maior via de aquisição destas *legal highs*.

Com a falta de informação acerca da composição real do *Kratom* comercializado nas *smartshops* e na Internet, e com a preocupação do perigo que possa apresentar para a saúde pública, um dos objetivos deste trabalho consistiu na caracterização química de 13 amostras comerciais em formatos e com potências diferentes, vendidas em 4 *smartshops* distintas e numa loja *online*. A caracterização química foi efetuada por GC-MS e pretende identificar e quantificar as substâncias maioritárias no *Kratom* com a maior atividade psicoativa descrita na literatura. De forma a estudar estas substâncias psicoativas, dada a ausência de trabalhos científicos que avaliem a toxicidade das amostras de *Kratom* comercializadas, um dos outros objetivos deste trabalho foi a avaliação da citotoxicidade de extratos de amostras comerciais previamente caracterizadas nas linhas celulares Caco-2 e SH-SY5Y, comparando com a toxicidade da MG pura – o componente maioritário desta droga, e que apresenta das maiores atividades psicoativas na mistura de alcalóides. Os modelos celulares foram escolhidos face ao consumo destes produtos por via oral, e consequente absorção intestinal (Caco-2), e à sua atividade psicoativa exercida ao nível do SNC (SH-SY5Y). Este estudo citotóxico ainda incluiu a investigação da potencial genotoxicidade de extratos das 3 amostras comerciais de *Kratom* mais citotóxicas e consumidas, na linha celular Caco-2, comparando também com o potencial genotóxico da MG. O potencial dano no DNA apenas foi estudado no modelo *in vitro* intestinal devido ao facto destas amostras serem consumidas por via oral.

Parte III

Material e Métodos

1. Amostras Comerciais de *Kratom* e Padrão de Mitraginina

Das 13 amostras comerciais de *Kratom* testadas no presente estudo, 8 foram compradas entre 2012 e 2013, antes da entrada em vigor do Decreto-Lei nº54/2013 [27], em 5 *smartshops* diferentes: Magic Mushroom, Freemind, Feelabong e Slowflavours, todas localizadas em Lisboa (Portugal), e na Euphoria Smartshop, no Porto (Portugal). Das restantes 5 amostras, 4 foram compradas em 2013, através na Internet, no *website* <http://azarius.pt>, e uma outra comprada através da Chromadex (Califórnia, EUA), um site de padrões para fins de investigação.

As amostras foram adquiridas em embalagens apelativas (**Figura 10**), com cores fortes, sendo designadas de acordo com a sua origem, tipo e potência, estando os nomes registados na **Tabela 6**. Elas apresentaram a forma de folhas secas partidas ou em pó, de extratos em pó e de resina. No caso dos extratos em pó, a maioria dos rótulos referencia a sua potência (15x ou 25x). Na maioria das embalagens também é referenciada a dose a tomar pelos consumidores para a manifestação um determinado efeito, o modo de preparação e cuidados a ter no consumo, assim como uma pequena introdução à origem e efeito da *Mitragyna speciosa*. As amostras de *Kratom* adquiridas através da Internet, continham um folheto informativo em várias línguas, com um esclarecimento sobre esta droga e com todas as formas de *Kratom* disponíveis (**Figura 10**).

A maioria das amostras apresentou uma cor castanha esverdeada, embora os extratos provenientes da Internet tenham apresentado cores diferentes como foi o caso do *Kratom Gold Extract* (Kr12BEg) com cor amarela e do *Kratom Red Extract 25x* (Kr13BEr25x) com cor vermelha.

O seu preço dependeu do tipo de amostra, da origem e da potência do *Kratom*. As folhas secas, quer partidas ou em pó, foram adquiridas em embalagens de 10 g e o seu preço variou entre 9,90, 19 e 21€, sendo que o *Kratom* da Tailândia e Malásia é mais caro que o de Bali. A resina foi adquirida em grande quantidade (15 g), por 14,75 €, porque cada dose consumida tem cerca de 2-3 g. Quanto aos extratos, o preço variou entre 11,16 e 17,50 € devido à diferença de potência e quantidade das amostras adquiridas (0,5 – 3 g). No entanto, a diferença de preços entre amostras com diferentes potências não parece ser coerente dado que, se compararmos todos os extratos provenientes da mesma loja *online*, o *Kratom Bali Extract 15x* (Kr11BE15x) foi mais caro

do que o *Kratom Red Extract 25x* (Kr13BEr25x), se calcularmos o preço por grama. Além disso, na embalagem do *Kratom Gold Extract* (Kr12BEg) não existe qualquer informação sobre a sua potência, contudo foi o produto mais caro. Também entre a dose a tomar pelos consumidores dos extratos e as potências existem discrepâncias: a porção de *Kratom Bali Extract 15x* (Kr02BE15x) e de *Kratom Bali Extract 25x* (Kr13BEr25x) para um efeito reduzido ou forte é semelhante, contudo o último é 10 vezes mais potente.

Tabela 6: Principais características das amostras comerciais de *Kratom* adquiridas em *smartshops* ou pela Internet.

	Descrição do Produto	Tipo	Origem	Preço	Quantidade	Loja	Informação do Rótulo
Kr01BF	<i>Kratom Bali Shredded</i>	Folhas secas partidas	Bali	19 €	10 g	Magic Mushroom (Lisboa)	Dose 5 - 10 g Comer com outros alimentos ou em batidos
Kr02BE15x	<i>Kratom Bali Extract 15x</i>	Extrato 15x em pó	Bali	17,50 €	1 g	Freemind (Lisboa)	Efeito reduzido: 0,5 g Efeito forte: 1-1,5 g Beber com sumo ou água
Kr03TF	<i>Kratom Thai Shredded</i>	Folhas secas partidas	Tailândia	21 €	10 g	Freemind (Lisboa)	Dose 5 - 10 g Comer com outros alimentos ou em batidos
Kr04TE15x	<i>Kratom Thai Extract 15x</i>	Extrato 15x em pó	Tailândia	17,50 €	1 g	Freemind (Lisboa)	Efeito reduzido: 0,1 - 0,3 g Efeito forte: 0,3 - 0,7 g Beber com sumo ou água
Kr05TF	<i>Kratom Herbal</i>	Folhas secas partidas	Tailândia	19 €	10 g	Feelabong (Lisboa)	-
Kr06TP	<i>Kratom Herbal</i>	Folhas secas em pó	Tailândia	21 €	10 g	Freemind (Lisboa)	Dose normal: 3 - 4 g
Kr07MP	<i>Kratom Malaysia Power</i>	Folhas secas em pó	Malásia	21 €	10 g	Slowflavours (Lisboa)	Dose 5 - 10 g Comer com outros alimentos ou em batidos
Kr08F	<i>Kratom Folhas</i>	Folhas secas partidas	-	9,90 €	10 g	Euphoria Smartshop (Porto)	Efeitos após 5-10 min Folhas moídas e ingeridas juntamente com água quente, chá ou café. Também se pode preparar um chá com as folhas.
Kr09BP	<i>Kratom Balinese (Mitragyna speciosa L.)</i>	Folhas em pó (Standard)	Bali	-	1 g	Chromadex	-
Kr10BR	<i>Kratom Bali Resin</i>	Resina	Bali	14,75 €	15 g	Azarius (http://azarius.pt)	Dose para principiantes: 2- 3 g Resina dissolvida em água quente e bebida como um chá. Adicionar mel ou açúcar.
Kr11BE15x	<i>Kratom Bali Extract 15x</i>	Extrato 15x em pó	Bali	13,50 €	3 g	Azarius (http://azarius.pt)	Efeito reduzido: 0,5 g Efeito forte: 1 - 1,5 g
Kr12BEg	<i>Kratom Gold Extract</i>	Extrato em pó	Bali	14,36 €	0,5 g	Azarius (http://azarius.pt)	Efeito reduzido: 0,15 g Efeito forte: 0,2 g
Kr13BEr25x	<i>Kratom Red Extract 25x</i>	Extrato 25x em pó	Bali	11,16 €	3 g	Azarius (http://azarius.pt)	Efeito reduzido: 0,5 g Efeito forte: 1 g



Figura 10: Aspeto de algumas amostras comerciais de *Kratom*: A – Amostras de *Kratom* adquiridas pela Internet e respetivo folheto informativo; B – *Kratom Folhas* (Kr08F); C – *Kratom Bali Resin* (Kr10BR); D - *Kratom Red Extract* 25x (Kr13BEr25x); E - *Kratom Gold Extract* (Kr12BEg); F- *Kratom Bali Extract* 15x (Kr11BE15x)

Após a aquisição das amostras, estas foram armazenadas num local seco à temperatura ambiente.

O padrão de MG foi adquirido à Chromadex (Califórnia, EUA) para permitir a identificação e quantificação da mesma nas amostras comerciais. O padrão foi armazenado a -20°C, protegido da luz, e num ambiente com controlo da humidade.

2. Caracterização Química de Amostras Comerciais de *Kratom* por GC-MS

2.1. Reagentes

O metanol (MeOH), o clorofórmio (CHCl₃), o acetato de etilo (AcOEt) e o etanol 96% (EtOH), todos de grau analítico, foram adquiridos à Fisher Chemicals (Loures, Portugal). O ácido clorídrico 37% (HCl) e o timol, usado como PI, foram comprados à Sigma-Aldrich (Saint Louis, Missouri, EUA).

Os filtros de seringa *Acrodisc®* hidrofóbicos com membrana de politetrafluoroetileno (PTFE) e porosidade 0,45 µm, usados para separar as partículas dos extratos e folhas do solvente, foram fornecidos pela *Nilabori* (Vila Nova de Gaia, Portugal).

2.2. Preparação das Soluções Padrão

A solução padrão *stock* de MG foi preparada em MeOH, numa concentração de 1 mg/mL. Esta solução foi armazenada a -80 °C, protegida da luz. Todas as soluções padrão de MG necessárias para a validação do método foram preparadas diariamente a partir desta solução *stock*, com as diluições apropriadas.

A solução *stock* de timol foi preparada em EtOH, na concentração de 1 mg/mL, sendo adicionado 50 µL desta a cada solução padrão de MG e de amostras de *Kratom* para a validação do método. Esta solução foi armazenada a 4°C, protegida da luz.

2.3. Extração da Mitraginina e Análogos das Amostras Comerciais de *Kratom*

Para a otimização da extração da MG e análogos das amostras comerciais de *Kratom* foram testados os solventes MeOH, EtOH e CHCl₃, e misturas entre eles, visto que estão descritos como os melhores solventes extratores para a MG e os seus análogos. Depois desta seleção, testou-se extrair as amostras por ultrassons com diferentes períodos de tempo (10, 20 e 60 min) e/ou através de extração líquido-líquido (LLE) com diferentes solventes (5% de HCl em H₂O; AcOEt; H₂O). Além disso, experimentou-se evaporar o solvente por corrente de azoto, até à secura das amostras, e voltar a ressuspender no mesmo solvente de extração ou noutro com melhor eficiência extrativa. Para separar as partículas em suspensão, alguns estudos recomendavam

também a filtração do solvente. Alguns dos processos extrativos descritos sugeriam que a extração ocorresse *overnight* para que esta fosse mais eficiente.

Depois de otimizado o processo extrativo, às amostras trituradas e homogeneizadas num almofariz adicionou-se CHCl_3 : MeOH (1:2) para se obter a concentração de 50 mg/mL, adicionando-se posteriormente 50 μL de timol. A mistura foi homogeneizada e extraída nos ultrassons durante 10 min. Deixou-se o solvente extrair as amostras durante a noite, num agitador KJ-201BY Rocking Mixer (Vidrolab2, Gandra, Portugal) com uma velocidade de 15 rpm. Finalmente, esta foi filtrada usando um filtro de seringa com membrana de PTFE com 0,45 μm para separar as partículas em suspensão. Este procedimento foi efetuado em triplicado para cada amostra, sendo injetados 2 μL de cada no GC-MS. O resumo do procedimento extrativo está descrito na **Figura 11**.

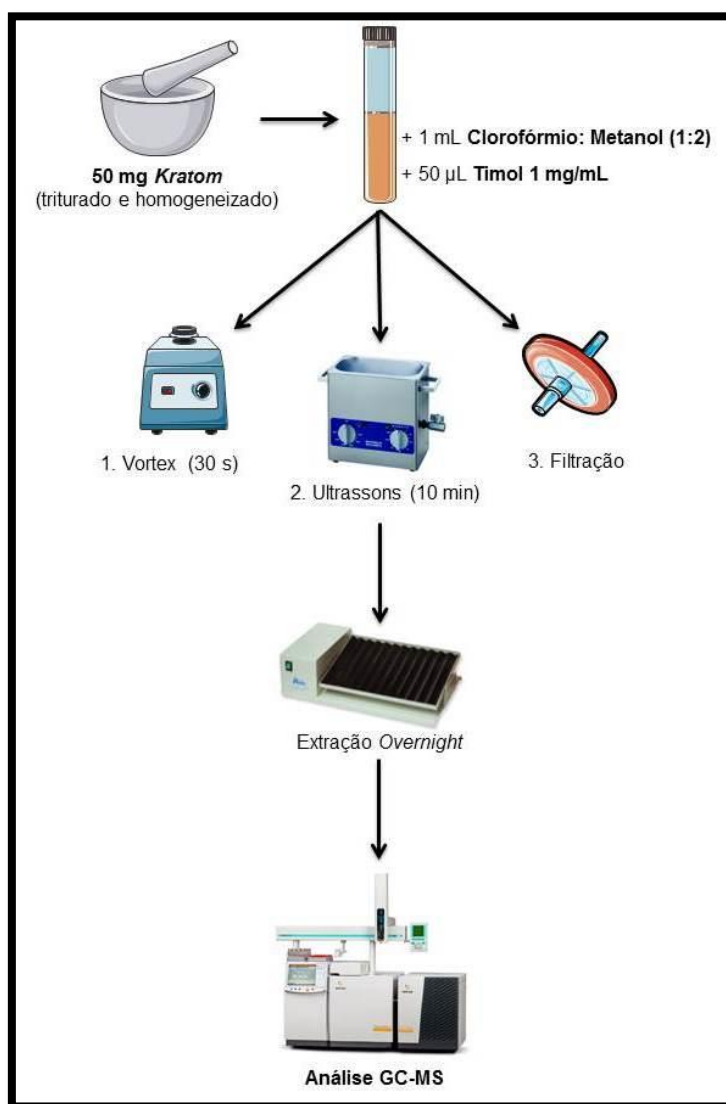


Figura 11: Procedimento de Extração das Amostras Comerciais de *Kratom*

2.4. Equipamento e Condições Cromatográficas

A análise cromatográfica foi realizada num sistema de GC-MS da Varian (EUA) composto por um cromatógrafo gasoso Varian CP-3800, um detetor de massa seletivo *Ion Trap* Varian Saturn 4000, um *autosampler* automático CombiPal e um *software* Saturn GC-MS Workstation versão 6.8. A coluna usada na separação cromatográfica foi uma coluna capilar VF-5MS (30 m x 0,25 mm x 0,25 μ m) também da Varian (EUA). A fase móvel foi o Hélio C-60, fornecido pela Gasin (Portugal), num fluxo constante de 1 mL/min. A temperatura inicial do forno da coluna foi de 100 °C, durante 1 min, aumentando depois para os 300 °C, subindo 15 °C por minuto, sendo esta a temperatura mantida até ao final da análise com a duração de 34,3 min. A energia de colisão no detetor foi de 70 eV, sendo que a ionização foi desligada durante os primeiros 4 minutos para evitar a sobrecarga do solvente. A corrente de emissão foi de 30 μ A e o tempo de ionização máximo 25000 μ s. A temperatura do *Ion Trap* foi ajustada a 180°C, do *Manifold* a 50 °C e do *Transfer Line* a 280 °C. Foram injetados 2 μ L de cada extrato, em *split mode* com um rácio de 1:10, a 250 °C. Os dados foram recolhidos de 40 a 1000 m/z em *Full Scan*, com um tempo de aquisição dos espectros de massa (m/z) entre 4 e 34 minutos, depois da injeção das amostras.

2.5. Validação do Método

O único estudo que compara diferentes tipos de amostras comerciais de *Kratom*, identificando e quantificando a MG e os seus análogos por LC-MS, é o de Kikura-Hanajiri et al. (2009), contudo o método analítico não foi validado corretamente visto que não segue as normas aceites para validação de métodos analíticos, faltando-lhe avaliar alguns parâmetros essenciais, como por exemplo o limite de deteção e quantificação [59].

Desta forma, a validação de um método analítico para amostras comerciais de *Kratom* diferentes tipos, potências e origem, vendidas nas *smartshops* e na Internet, é proposta neste trabalho para que haja uma maior informação sobre a sua composição, para os consumidores e autoridades competentes, e também para se poder avaliar o perigo do consumo desta droga para a saúde pública. Além disso, para o estudo de citotoxicidade dos extratos destas amostras proposto neste trabalho, é imprescindível o conhecimento de outras substâncias psicoativas presentes nesta droga, para além da MG, sendo este avançado pelo método analítico desenvolvido.

A validação do método analítico descrito foi orientada pelas normas internacionais recomendadas pela Agência Europeia de Medicamentos (EMA) sendo estudados parâmetros como a seletividade, a linearidade (modelo de calibração), a sensibilidade (limites de detecção e quantificação) e a precisão (repetibilidade e reprodutibilidade) [132].

2.5.1. Linearidade

Para a avaliação da linearidade do método proposto, várias soluções de calibração do padrão de MG foram preparadas com as concentrações de 750, 500, 200, 100, 50, 10 e 5 µg/mL, por diluições sucessivas. Foram feitas duas curvas de calibração de modo a possuímos uma linearidade para uma gama de concentrações mais elevada e outra para concentrações mais baixas nas amostras de *Kratom*. A regressão linear foi obtida usando a área do pico do analito em função da sua concentração, sendo que a linearidade foi avaliada pelo coeficiente de correlação linear (R^2).

Para quantificar os análogos da MG, como a CORY A/ B, a 7-OHMG, a ESPC, a PAY e a ESPG, dada a ausência dos padrões correspondentes a estes compostos, as curvas de calibração da MG foram adaptadas para estes analitos visto que são compostos muito semelhantes na sua estrutura química.

2.5.2. Sensibilidade

Neste trabalho, o limite de detecção (LOD) e de quantificação (LOQ) foram calculados com base na relação sinal-ruído. Para o cálculo do LOD, o valor da relação sinal-ruído foi multiplicado por 3, e para o LOQ foi multiplicado por 10, sendo estas as fórmulas aceites para estimar a sensibilidade [132].

2.5.3. Precisão

Para a avaliação da precisão do método, foi calculada a precisão *intra-day* e a precisão *inter-day* com a respetiva média, desvio-padrão (DP) e coeficiente de variação em percentagem (%CV). Segundo as normas aceites para validação de métodos analíticos, o valor da %CV tem de ser inferior a 20% para o método ser considerado válido [132].

2.5.3.1. Precisão *Intra-day*

A precisão *intra-day* foi determinada pela análise de 3 réplicas de extratos da mesma amostra, no mesmo dia, pelo mesmo operador. Avaliou-se este parâmetro para todos os analitos, usando extratos com concentração de 50 mg/mL de uma amostra comercial de *Kratom*.

2.5.3.2. Precisão *Inter-day*

A precisão *inter-day* foi determinada para todos os analitos, usando 3 réplicas de extrato de uma amostra comercial de *Kratom*, com concentração de 50 mg/mL. A análise dos extratos foi feita em três dias diferentes, pelo mesmo operador.

3. Estudo da Citotoxicidade do Padrão de Mitraginina e de Extratos de Amostras Comerciais de *Kratom* nas linhas celulares Caco-2 e SH-SY5Y

3.1. Cultura Celular

As linhas celulares Caco-2 (ATCC® HTB-37) e SH-SY5Y (ATCC® CRL-2266) foram fornecidas pelo *American Type Culture Collection* (ATCC; Rockville, MD, EUA). Ambas as linhas celulares foram mantidas numa atmosfera de 5% CO₂-95% ar, a 37°C. O meio de cultura usado para as duas linhas celulares foi o meio essencial de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), fornecido pela Sigma-Aldrich (Madrid, Espanha), suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS), 1% de solução de estreptomicina-penicilina e 1% de Fungizone®. Para a sua subcultura, as células foram destacadas com 2 e 4 mL de uma solução de tripsina-EDTA (0,25%) e cultivadas em frascos T25 e T75, respetivamente. A densidade celular inicial dos frascos foi de 10 000 células por cm², sendo que a subcultura foi realizada até ao máximo de 10 passagens. Todos os restantes reagentes usados na cultura celular foram fornecidos pela Gibco (Madrid, Espanha).

Depois de atingirem a confluência, o fenótipo, assim como a morfologia e os aspetos funcionais das células Caco-2 são semelhantes aos enterócitos do epitélio intestinal humano. As células SH-SY5Y são uma linha celular neuronal derivada de um neuroblastoma humano. Nas células Caco-2, o meio de cultura foi substituído a cada 2 dias, e nas células SH-SY5Y a cada 3 dias.

3.2. Preparação das soluções do padrão de Mitraginina e dos extratos das amostras comerciais de *Kratom*

A solução padrão *stock* de MG foi preparada em MeOH, numa concentração de 1 mg/mL. Esta solução foi armazenada a -80 °C, protegida da luz. As soluções de MG utilizadas nos ensaios de citotoxicidade, foram preparadas a partir das respetivas diluições da solução *stock*, em meio de cultura DMEM, sem FBS e vermelho de fenol (**Figura 12**).

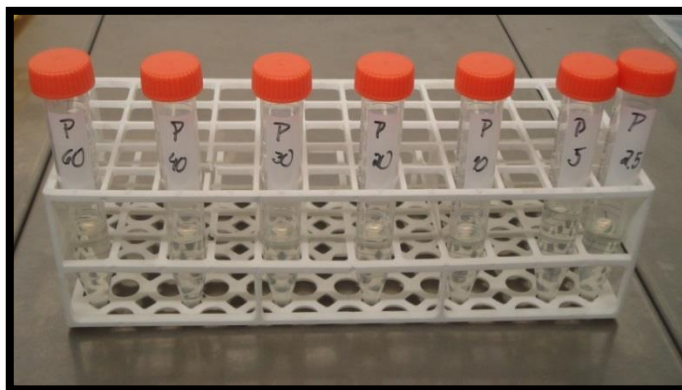


Figura 12: Imagem das soluções do padrão de mitraginina (MG) usadas nos ensaios de citotoxicidade (60, 40, 30, 20, 10, 5 e 2,5 µg/mL).

Todas as soluções dos extratos das amostras comerciais de *Kratom* foram preparadas tendo em conta a concentração de MG de cada extrato, obtida a partir da caracterização química por GC-MS. Deste modo, foi pesada a quantidade de cada amostra que representasse a mesma quantidade de MG para todas elas, de modo a que todas as soluções *stock* das amostras estivessem com a concentração de 1 mg/mL de MG. Na preparação destas soluções *stock*, as amostras foram trituradas num almofariz, extraídas com CHCl₃:MeOH (1:2) e homogeneizadas por ultrassons durante 10 min. Deixou-se o solvente a extrair as amostras durante a noite, num agitador. No dia seguinte, o solvente foi filtrado por um filtro de seringa com membrana PTFE 0,45 µm e evaporado até à secura em corrente de azoto. Finalmente, os resíduos foram ressuspensos em MeOH, agitando no *vortex*, durante cerca de 1 min. Todas as soluções dos extratos das amostras comerciais de *Kratom* utilizadas nos ensaios de citotoxicidade foram preparadas em meio de cultura DMEM, sem FBS e vermelho de fenol, com as respetivas diluições. A gama de concentração testada foi escolhida de acordo com os estudos existentes na literatura [133]. (**Figura 13**)

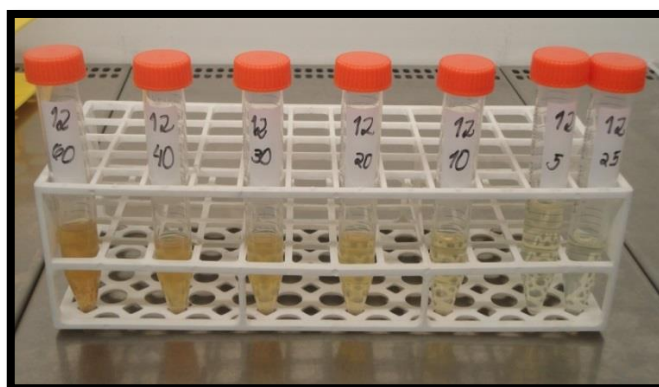


Figura 13: Imagem das soluções de um extrato de uma amostra comercial de *Kratom* usadas nos ensaios de citotoxicidade (*Kratom Bali Resin* - 60, 40, 30, 20, 10, 5 e 2,5 µg/mL).

3.3. Ensaios de Citotoxicidade

Para avaliar a citotoxicidade induzida pelo padrão de MG e pelos extratos das amostras comerciais de *Kratom*, foi estudada a viabilidade celular das células Caco-2 e SH-SY5Y, em confluência, recorrendo à avaliação da sua atividade metabólica e integridade da membrana lisossomal com os ensaios de redução do brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT) e de captação do vermelho neutro (NR), respetivamente. Além do estudo da viabilidade celular, nas células Caco-2 também o dano no DNA induzido pelo padrão de MG e pelos extratos das amostras comerciais de *Kratom* foi avaliado pelo ensaio Cometa. Neste ensaio, as células foram expostas aos compostos quando apresentaram uma confluência de aproximadamente 70%.

3.3.1. Atividade metabólica - Ensaio de Redução do Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT)

O ensaio de redução do MTT foi o primeiro ensaio de viabilidade celular, desenvolvido para um formato de placas de 96 poços, tendo como objetivo avaliar a atividade metabólica das células, quantificando a redução do MTT a cristais de formazano de cor púrpura – conversão que só acontece em células viáveis. As enzimas mitocondriais são as responsáveis por esta conversão, sendo que as desidrogenases associadas ao NADPH e NADH são as envolvidas na reação pela transferência de eletrões (**Figura 14**) [134, 135].

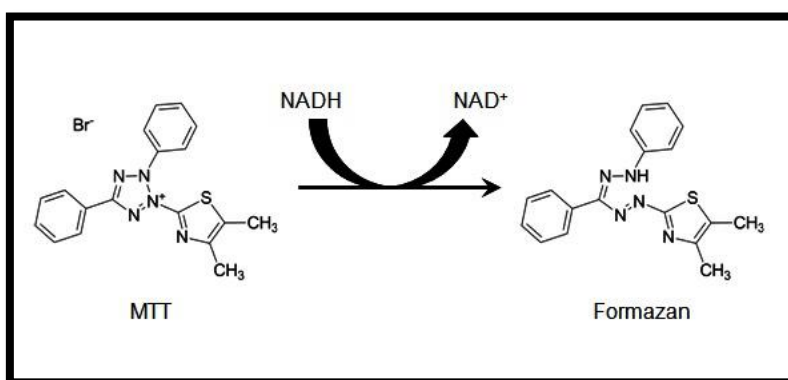


Figura 14: Reação de conversão do MTT em cristais de formazano.

Para este ensaio, as sementeiras para as duas linhas celulares foram feitas em placas de 96 poços (Falcon; BD Sciences, Oxford, Reino Unido), com uma densidade de 10 000 células/poço para as Caco-2 e 23 800 células/poço para as SH-SY5Y. Depois de atingirem a confluência, o meio de cultura foi suavemente aspirado e ambas as linhas

foram expostas a concentrações crescentes de MG e de extratos de amostras comerciais de *Kratom* (0; 2,5; 5; 10; 20; 30; 40; 60 µg/mL), e ao respetivo veículo (MeOH 6%), por um período de 6 e 24 h. No final de cada período de tempo, todos os poços foram aspirados e as células foram incubadas com uma solução de MTT (0,5 mg/mL) numa atmosfera húmida com 5% CO₂-95% ar. O tempo de incubação com MTT para as Caco-2 foi de 1 h, enquanto para as SH-SY5Y foi de 3 h devido ao seu metabolismo mais lento. As células pré-incubadas durante 30 min com etanol 70% foram utilizadas como controlo positivo. Alcançado o tempo de incubação com o MTT, a solução de MTT foi aspirada e os cristais de formazano formados dissolvidos com dimetilsulfóxido (DMSO). A análise espectralométrica foi feita a 550 nm usando um espectrofotómetro de microplacas (PowerWaveX; Bio-Tek, Winooski, VT, EUA) com subtração da absorvância no comprimento de onda de referência (690 nm). Os resultados encontram-se apresentados em percentagem das células viáveis em relação às células não-expostas. O MTT usado neste ensaio foi fornecido pela Sigma-Aldrich (Madrid, Espanha), sendo que o DMSO e o etanol 70% foram comprados à Fisher Chemicals (Loures, Portugal).

3.3.2. Integridade da Membrana Lisossomal – Ensaio de Captação do Vermelho Neutro (NR)

Para além dos métodos de determinação da viabilidade por avaliação da atividade celular, existem outros ensaios onde é usado um corante para a determinação das células viáveis. O ensaio de captação do NR é um desses exemplos, onde as células viáveis incorporam, por transporte ativo, um corante catiónico fraco (NR) e acumulam-no intracelularmente nos lisossomas. A eficiência desta retenção depende do pH dos lisossomas e da eficácia da bomba de prótons ligados à membrana lisossomal, responsáveis pelo pH ácido dos lisossomas. Contudo, os xenobióticos podem alterar a superfície celular e destabilizar esta membrana lisossomal permitindo que o NR se liberte para o citosol, resultando numa diminuição da captação e ligação do NR. Com base nestas diferenças, é possível fazer a distinção entre as células viáveis e as células danificadas ou mesmo inviáveis [136, 137].

Neste ensaio, as sementeiras para as duas linhas celulares foram feitas em placas de 96 poços, com uma densidade de 10 000 células/poço para as Caco-2 e 23 800 células/poço para as SH-SY5Y. Após atingirem a confluência, o meio de cultura foi suavemente aspirado e ambas as linhas celulares foram expostas a concentrações crescentes de MG e de extratos de amostras comerciais de *Kratom* (0; 2,5; 5; 10; 20; 30; 40; 60 µg/mL), e ao respetivo veículo (MeOH 6%), por um período de 6 e 24 horas. No

final de cada período de tempo, todos os poços foram aspirados e as células foram incubadas com uma solução de NR 0,33%, durante 2 h, numa atmosfera húmida com 5% CO₂-95% ar. Células pré-incubadas durante 30 min com etanol 70% foram utilizadas como controlo positivo. Alcançado o tempo de incubação com o NR, a solução foi aspirada e o corante retido nos lisossomas celulares foi dissolvido pela adição de uma solução de lise (50% etanol, 1% ácido acético e 49% de água destilada). A análise espectrofotométrica foi feita a 540 nm usando um espectrofotómetro de microplacas (PowerWaveX; Bio-Tek, Winooski, VT, EUA) com subtração da absorvância no comprimento de onda de referência (690 nm). Os resultados encontram-se apresentados em percentagem das células viáveis em relação às células não-expostas. A solução *stock* de NR 3,33% usada neste ensaio foi fornecida pela Sigma-Aldrich (Madrid, Espanha), sendo que o Etanol Puro e a 70% foram comprados à Fisher Chemicals (Loures, Portugal). O ácido acético glacial foi adquirido à Merck (Darmstadt, Alemanha).

3.3.3. Dano no DNA – Ensaio Cometa

O ensaio cometa é um método simples para a avaliação das ruturas nos filamentos do DNA em células eucarióticas, cada vez mais utilizado na avaliação de genotoxicidade de vários produtos químicos, na epidemiologia molecular e biomonitorização humana, na ecogenotoxicologia, assim como na investigação dos danos e mecanismos de reparação do DNA. Neste ensaio, as células são colocadas numa lâmina embebida em agarose, procedendo-se à sua lise para formar nucleoides contendo *loops* de DNA super-enrolados ligados à matriz nuclear. Depois de corrida a eletroforese a pH alcalino nas lâminas, resultam estruturas semelhantes a cometas, observadas por microscopia de fluorescência, onde a intensidade da sua cauda relativamente à cabeça, reflete o número de quebras no DNA. Os cometas obtidos após a eletroforese podem ser explicados pelo facto das quebras existentes nos *loops* do DNA fazerem perder o seu enrolamento, tornando-se livres para se estenderem em relação ao ânodo [138]. Existem várias variantes do ensaio cometa, mas no âmbito deste trabalho o ensaio foi realizado em condições alcalinas, de acordo com o protocolo descrito por Singh et al.(1988), ao qual foram introduzidas algumas modificações segundo Fraga et al. (2013) [139, 140].

Resumidamente, as sementeiras das células Caco-2 foram feitas em placas de 24 poços, com uma densidade de 60 000 células/poço. As culturas em semi-confluência foram expostas ao padrão de MG e aos extratos de 3 amostras comerciais de *Kratom* nas concentrações de 0; 2,5 e 5 µg/mL, e ao respetivo veículo (MeOH 0,5%), durante 24 h. Os extratos das amostras Kr10BR, Kr11BE15x e Kr12BEg foram os selecionados para

esta avaliação porque se verificaram ser os mais citotóxicos nos ensaios anteriores e também por serem das amostras mais consumidas pelos utilizadores. Uma solução de metilmetanosulfonato (MMS) 500 μ M foi utilizado como controlo positivo, incubando as células durante 1 h antes do ensaio. No final do período de exposição, o meio de cultura foi aspirado e adicionada uma solução tripsina-EDTA (0,25%) a todos os poços, durante 5 min. A solução de tripsina-EDTA (0,25%) foi neutralizada com meio de cultura, e as células são recolhidas para um tubo e centrifugadas a 300 g, durante 10 min. O *pellet* foi lavado e ressuspendido numa solução salina de tampão fosfato (PBS) pH 7,4, sendo de seguida centrifugado a 9000 rpm, durante 3 min. O *pellet* foi novamente ressuspendido em PBS pH 7,4. A viabilidade celular das suspensões foi determinada pelo método da exclusão do Azul Tripiano (Gibco; Madrid, Espanha). A densidade celular de todas as amostras foi ajustada a 40 000 células, sendo estas posteriormente centrifugadas a 9000 rpm, durante 3 min. Os vários *pellets* foram ressuspendidos em 100 μ L de agarose com baixo ponto de fusão 0,6% (*low melting point*) (Sigma Aldrich; Madrid, Espanha) e 5 μ L dessa suspensão celular aplicados em lâminas de microscópio (VWR; Darmstadt, Alemanha) revestidas com agarose com ponto de fusão normal 1% (*normal melting point*) (Sigma Aldrich; Madrid, Espanha). Os géis foram solidificados a 4°C, durante 10 min, e as lâminas imersas numa solução de lise fria (2,5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM Tris Base, 2% Triton X-100) durante a noite, a 4°C, protegidas da luz. No dia seguinte, as lâminas foram transferidas para uma tina de eletroforese contendo tampão de eletroforese preparado no dia (1 mM EDTA, 300 mM NaOH pH> 13), onde foram mantidas durante 40 min, a 4 °C, para permitir o desenrolamento do DNA. A eletroforese foi realizada no mesmo tampão, durante 20 min, a 29 V e 300 mA. As lâminas foram lavadas com PBS pH 7,4 e água desionizada, ambos a 4 °C, e os géis fixados com etanol 70% e 90%. Após a secagem das lâminas durante a noite, o DNA foi corado com uma solução 0,07% de SYBR Gold (Molecular Probes; Paisley, Reino Unido). As lâminas foram codificadas procedendo-se à análise dos cometas usando um microscópio de fluorescência e o *software* de análise de imagem *Comet Assay IV* (Perceptive Instruments; Suffolk, Reino Unido) (**Figura 15**). A percentagem de DNA na cauda do cometa e o *olive tail moment* foram os parâmetros usados como medidas de quantificação do dano do DNA. Por cada gel, foram contadas 100 células e três experiências independentes foram feitas em duplicado.

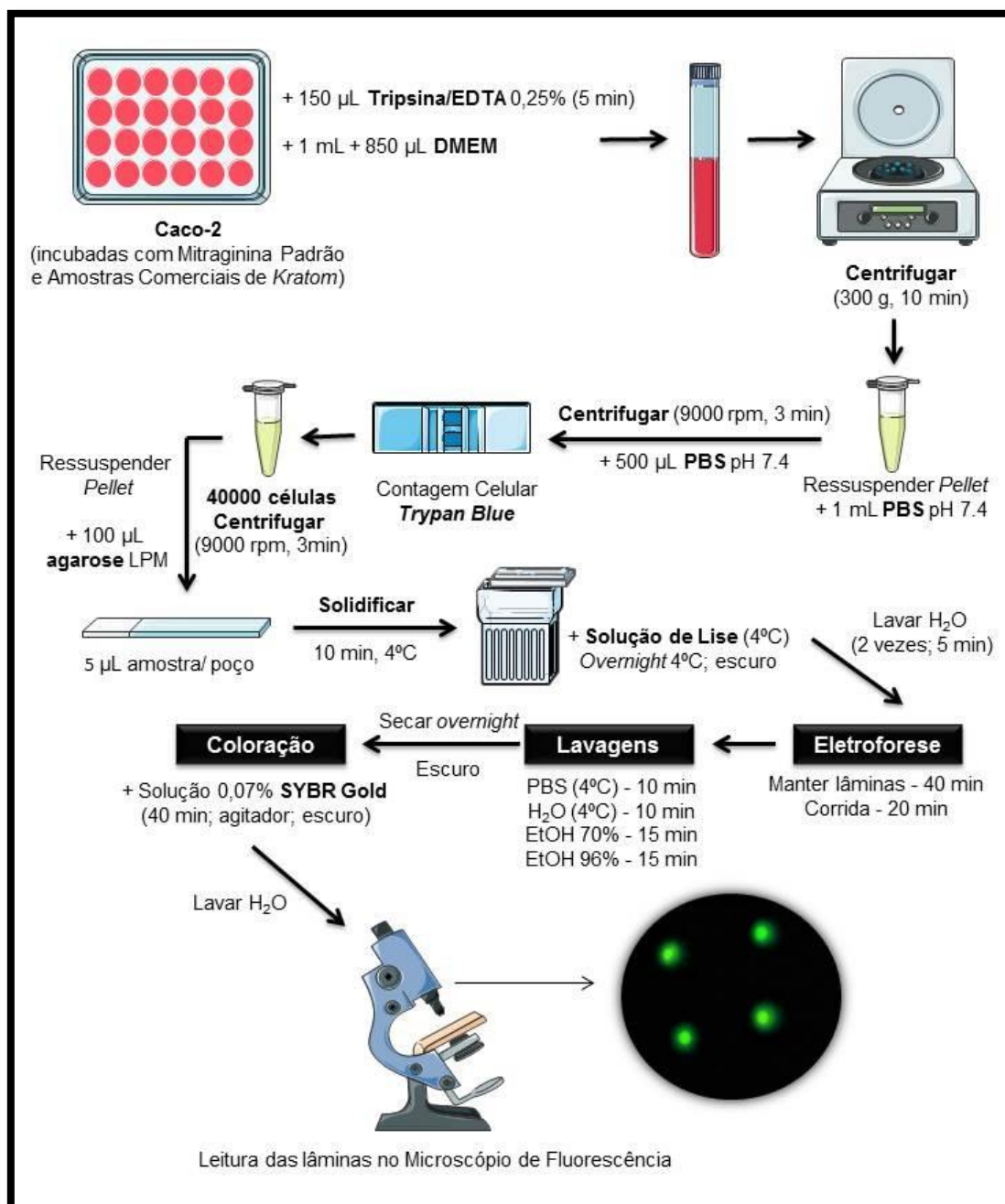


Figura 15: Esquema representativo do protocolo do ensaio cometa adotado no presente trabalho.

3.3.4. Análise Estatística

Os resultados de todos os ensaios de citotoxicidade encontram-se expressos pela média \pm erro padrão da média (SEM). A análise dos dados foi feita recorrendo ao *software* GraphPad Prism 6 (San Diego, CA, EUA). A normalidade dos dados foi testada usando os testes de normalidade de *D'Agostino-Pearson*, *Shapiro-Wilk* e *Kolmogorov-Smirnov*. A análise estatística dos resultados foi realizada recorrendo a testes

paramétricos e não paramétricos. A análise paramétrica foi feita usando o teste de análise de variância de um fator (*one-way ANOVA*) seguido do teste de comparação múltipla de *Dunnett*. A análise não paramétrica foi realizada utilizando o teste de *Kruskal-Wallis*, seguido do teste de comparação múltipla de *Dunn*. As curvas de concentração-resposta foram obtidas usando o método dos mínimos quadrados (*least squares*) e a comparação entre as curvas foi feita usando o teste F (*extra sum-of-squares F-test*). A significância estatística foi aceita para um valor de $p < 0,05$.

Parte IV

Resultados

1. Caracterização Química de Amostras Comerciais de *Kratom* por GC-MS

1.1. Otimização da Extração

De acordo com os métodos analíticos descritos na literatura para amostras comerciais de *Kratom* e para a planta *Mitragyna speciosa* [31, 54, 56, 58, 59, 71, 129], foram testados no presente trabalho vários processos extrativos, nomeadamente diferentes solventes e técnicas de extração. Na **Tabela 7** estão resumidamente apresentados os vários processos extrativos testados, como também as áreas dos picos cromatográficos obtidas, com a respetiva média, DP e % CV, para a CORY A/B, 7-OHMG, a ESPC, a MG, a PAY e a ESPG. (**Tabela 7; Figura 16**)

Com a apresentação dos resultados das áreas dos picos cromatográficos na **Tabela 7 e Figura 16**, observa-se nitidamente que os processos extrativos mais eficientes foram as extrações recorrendo à mistura de solventes CHCl_3 : MeOH com ultrassonização. Além destes, também a extração B mostrou ser das mais eficazes com a utilização da extração por ultrassons com MeOH. No entanto, nesta extração, como também nas outras onde se utilizou MeOH como solvente extrator, a resolução cromatográfica dos picos não era adequada à análise, sendo por isso preferível a utilização da sua mistura com CHCl_3 . Com estes resultados, foi otimizado o processo extrativo com estes solventes, recorrendo a uma mistura intermédia de CHCl_3 :MeOH (1:2), utilizando a ultrassonização por 10 min e deixando extrair a mistura durante a noite. Finalmente, esta foi filtrada usando um filtro de seringa de PTFE 0,45 μm para que não houvesse partículas em suspensão que pudessem danificar o sistema cromatográfico. Esta otimização corresponde ao processo extrativo H, onde se obteve claramente as maiores áreas dos picos para a maioria dos analitos, como também a melhor resolução cromatográfica. Esta extração é uma das mais simples e rápidas dentro dos estudos existentes do *Kratom*, além de utilizar apenas 50 mg de amostra, conseguindo extrair a grande parte dos análogos da MG. Estes extratos das amostras comerciais de *Kratom* analisadas foram usados nos estudos de citotoxicidade.

Tabela 7: Áreas dos picos cromatográficos da MG e análogos obtidas com diferentes processos extrativos.

		CORY A/B	7-OHMG	ESPC	MG	PAY	ESPG	Referência
Extração	A	Média	n.d.	342622	4777000	640472	1261000	[54]
		DP		28369	274197	86851	154048	
		%CV		8,28	5,74	13,56	12,22	
	B	Média	189958	1230500	13470000	2436500	5032500	[58]
		DP	27361	99702	523259	229810	488611	
		%CV	1,73	8,10	3,88	9,43	9,71	
	C	Média	21644	431280	4104333	703024	1393667	[31]
		DP	2081	64436	167599	122399	209395	
		%CV	9,62	14,94	4,08	17,41	15,02	
	D	Média	22439	508441	4955000	732285	1684667	[129]
		DP	1798	21496	214502	34656	65896	
		%CV	8,01	4,23	4,33	4,73	3,91	
	E	Média	19402	217905	2024500	309264	681687	[59]
		DP	376	2067	36062	1201	130	
		%CV	1,94	0,95	1,78	0,39	0,02	
	F	Média	n.d.	1561667	15963333	2889333	6005333	[56]
		DP		114168	1364563	390769	726978	
		%CV		7,31	8,55	13,52	12,11	
	G	Média	263496	1130471	12006667	2020667	4516000	[71]
		DP	49108	197688	1581971	367193	720446	
		%CV	18,64	17,49	13,18	18,17	15,95	
	H	Média	517309	534163	18360000	3292667	7286000	-
		DP	71521	24546	576628	135445	449964	
		%CV	13,83	4,60	3,14	4,11	6,18	

Os resultados encontram-se representados pela média, desvio padrão (DP) e coeficiente de variação em percentagem (% CV). Todos os processos extrativos foram feitos em triplicado.

n.d: Não detetado; Inferior ao Limite de Detecção.

A – EtOH/ Centrifugação (5 min, 3 000 rpm)/ Filtração sobrenadante/ Ressuspensão em AcOEt;

B – MeOH/ Ultrassons (20 min)/ Centrifugação (5 min, 3000 rpm)/ Filtração;

C – MeOH (*overnight*) / LLE com 5% de HCl em H₂O e AcOEt/ Ressuspensão em MeOH;

D – MeOH (*overnight*)/ Filtração/ Ressuspensão em CHCl₃/ LLE com H₂O/ Ressuspensão com EtOH;

E – MeOH 80%/ Ultrassons (1h)/ Extração *overnight*/ Centrifugação (5 min; 3000 rpm)/ Filtração;

F – CHCl₃: MeOH (1:4)/ Ultrassons (10 min)/ Filtração;

G – CCl₃: MeOH (1:4)/ Ultrassons (1h)/ Extração *overnight*/ Ressuspensão em CHCl₃: MeOH (1:4);

H – CHCl₃: MeOH (1:2) / Ultrassons (10 min)/ Extração *overnight*/ Filtração.

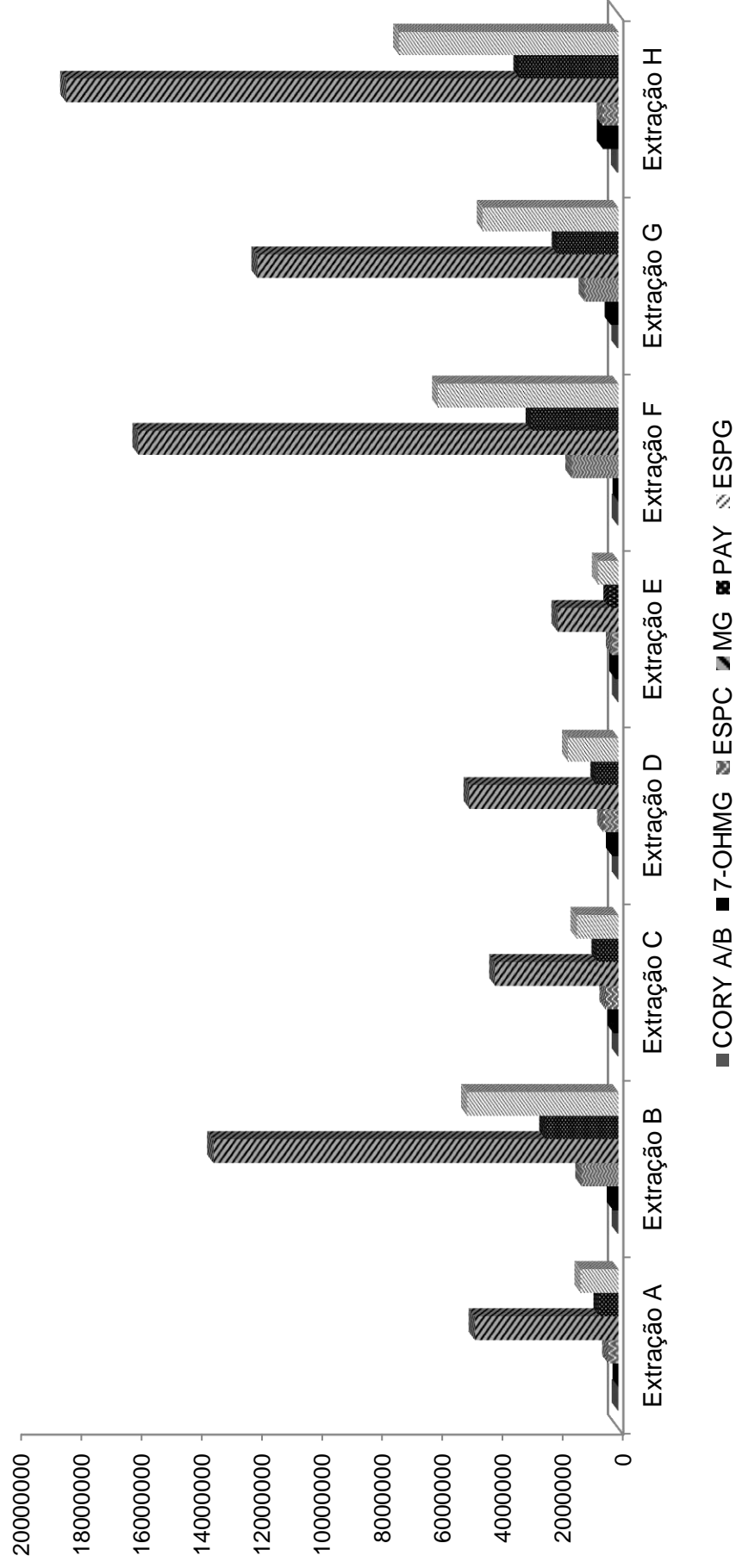


Figura 16: Extração da MG e análogos com diferentes processos extrativos.

1.2. Identificação da Mitraginina e Análogos nos Extratos de Amostras Comerciais de *Kratom*

A identificação da MG foi feita por comparação do tempo de retenção e espectro de massa das amostras comerciais de *Kratom* testadas com o padrão injetado nas mesmas condições cromatográficas para a sua correta identificação. Relativamente aos seus análogos, os seus padrões não estão disponíveis devido ao seu elevado custo, sendo que estas substâncias foram identificadas segundo as bibliotecas de espectros de massa do *National Institute of Standards and Technology* (NIST05) e *Scientific Working Group for the Analysis of Seized Drugs* (SWGDRUG), bem como por espectros de massa da literatura. Na **Tabela 8**, estão descritos os tempos de retenção e os iões característicos da MG e análogos detetados por GC-MS.

Tabela 8: Tempo de retenção e iões característicos dos compostos detetados por GC-MS

Composto	Padrão	Biblioteca	Tempo de retenção (min)	Iões característicos (m/z)
CORY A/ B	Não disponível	-	15,6	208;224;239;384
7-OHMG	Não disponível	-	16,9	239;367;414
ESPC	Não disponível	SW/NIST	18,0	214;383;397;398
MG	Disponível	SW/NIST	19,4	214;383;397;398;399
PAY	Não disponível	-	19,7	214;381;396
ESPG	Não disponível	SW/NIST	20,0	214;383;397;398

SW = Biblioteca SWGDRUG; NIST = Biblioteca NIST05

Além disso, no estudo de Wang et al. (2014), é apresentado um cromatograma de uma mistura padrão de *Kratom*, como também de um extrato da droga, onde o perfil cromatográfico é idêntico ao obtido nas nossas amostras comerciais, o que facilitou também a identificação dos compostos (**Figura 17**) [31].

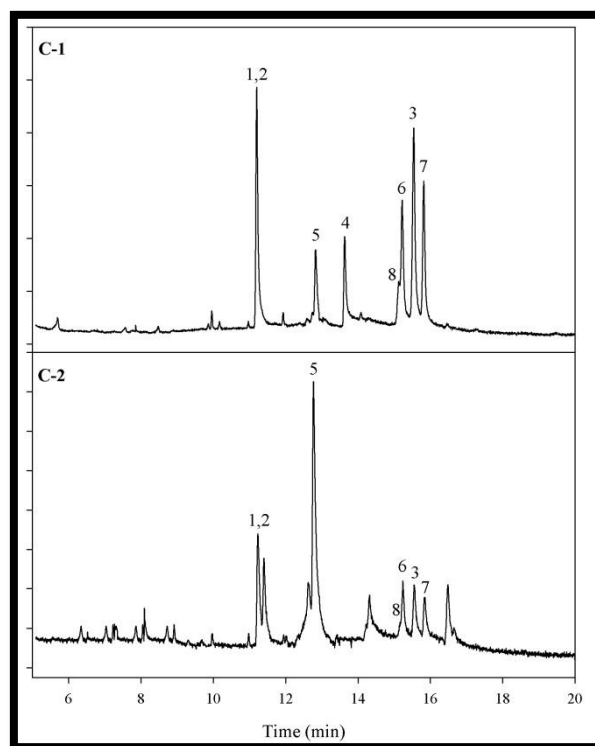


Figura 17: Cromatogramas do estudo de Wang et al. (2014): C-1: Mistura Padrão de *Mitragyna speciosa*; C-2: Extrato de alcalóides da *Mitragyna speciosa*; 1- CORY A/B; 2- PAY; 5- 7-OHMG; 8 – ESPC; 6- MG; 3- Isopainanteína (ISOPAY); 7- ESG. Adaptado de Wang et al. (2014)

1.2.1. Detecção da Mitraginina

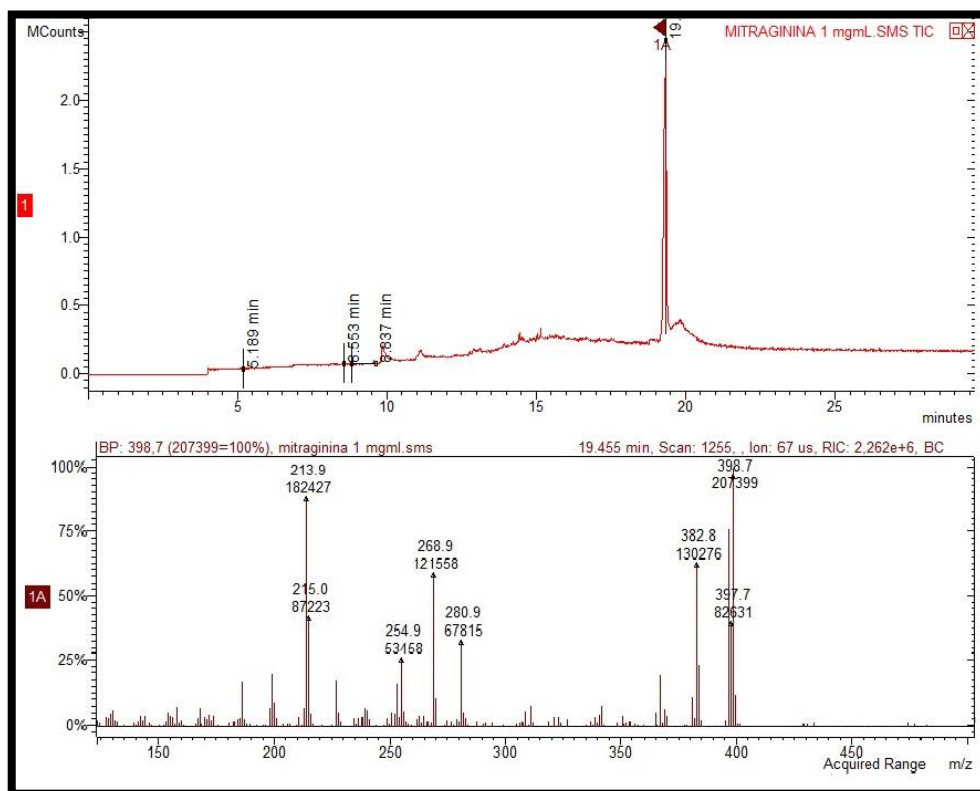


Figura 18: Cromatograma em *Full Scan* do padrão de MG (1) e o seu respetivo espetro de massa (1A).

Como se pode verificar pelo espetro de massa do padrão de MG, na **Figura 18**, os m/z mais intensos são o 214, 383, 397, 398 e 399, sendo estes os iões característicos do composto, e por isso usados na identificação da MG nos extratos das amostras comerciais de *Kratom*. Tal como observado no cromatograma da **Figura 18**, o tempo de retenção da MG é de 19,455 min, sendo este um ponto de referência para a sua identificação nas amostras.

Em ambas as bibliotecas, NIST05 e SWGDRUG, o espetro de massa do padrão de MG corresponde a 84% do espetro registado nas bibliotecas.

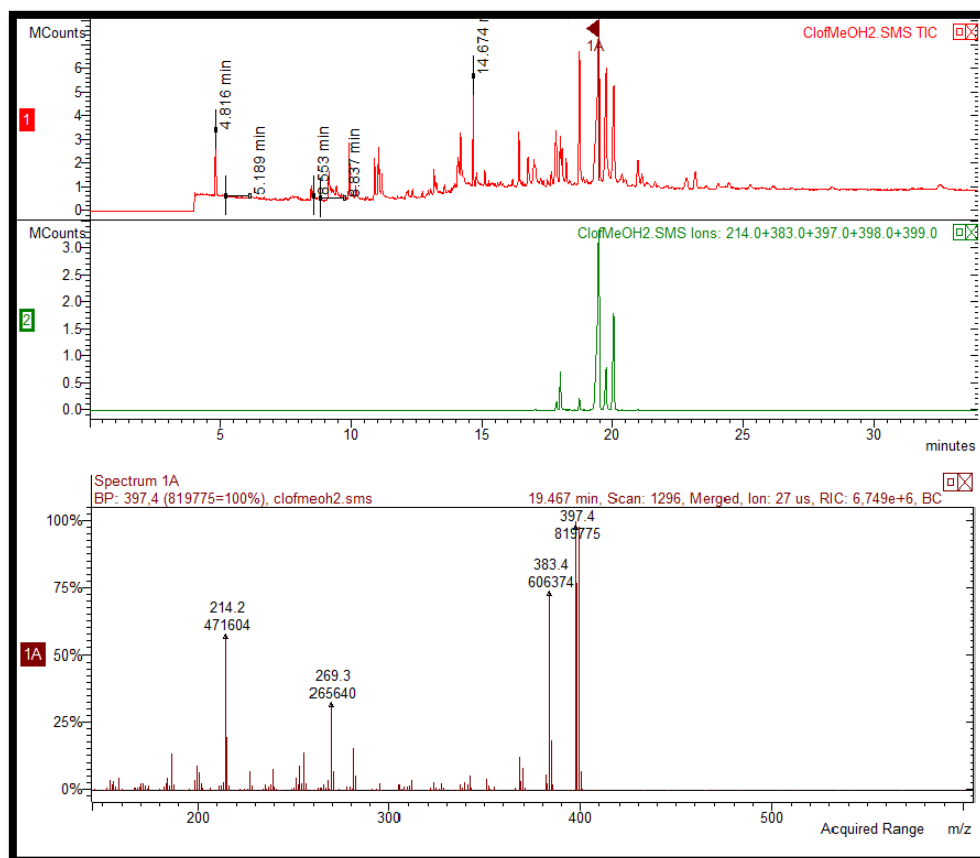


Figura 19: Cromatograma em *Full Scan* (1) e cromatograma reconstruído com os iões característicos da MG (2) (214, 383, 397, 398, 399 m/z) e o seu respetivo espetro de massa (1A) no extrato Kr11BE15x de uma amostra comercial de *Kratom*.

Na **Figura 19**, identificou-se o pico da MG num extrato de amostra comercial de *Kratom* com o tempo de retenção 19,467 minutos, tal como no seu padrão. O seu espetro de massa contém os mesmos iões característicos do padrão de MG, o que comprova a sua correta identificação. Consoante o espetro de massa das bibliotecas de espetros NIST05 e SWGDRUG, conseguiu-se identificar a MG com uma probabilidade de 67,8%.

1.2.2. Detecção da 7-hidroximitraginina

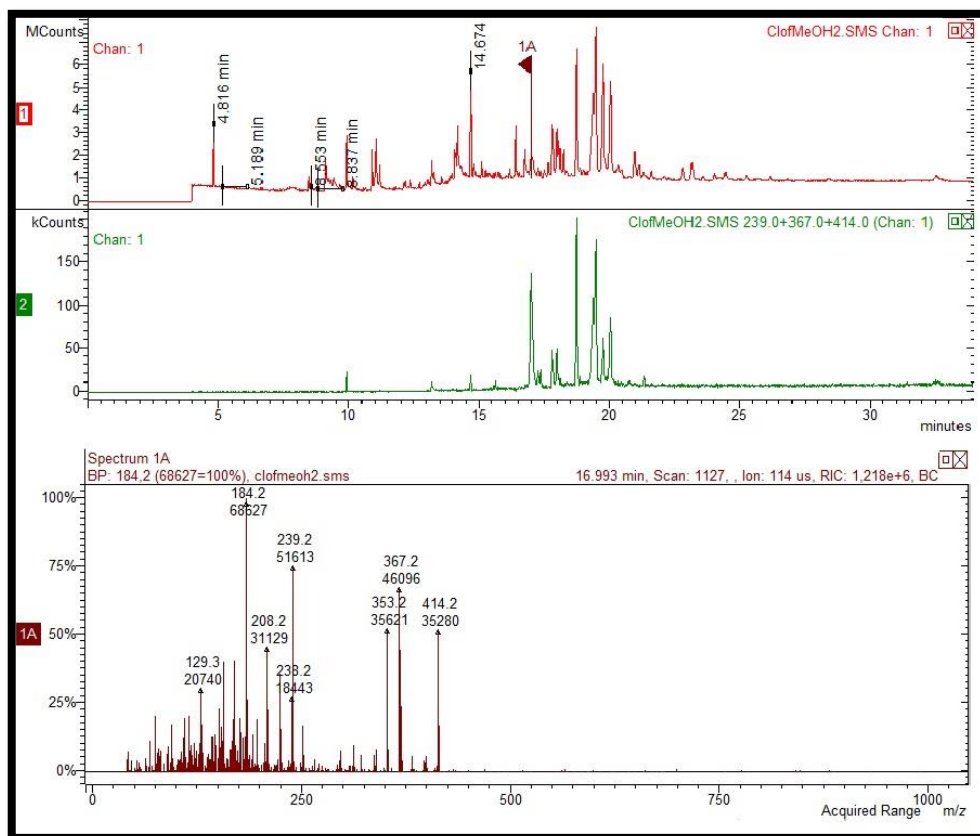


Figura 20: Cromatograma em *Full Scan* (1) e cromatograma reconstruído com os iões característicos da 7-OHMG (2) (239, 367, 414 m/z) e o seu respetivo espetro de massa (1A) no extrato Kr11BE15x de uma amostra comercial de *Kratom*.

Devido à indisponibilidade do padrão de 7-OHMG e do seu espetro de massa nas bibliotecas de espetros, a sua identificação foi baseada nos estudos de Kikura-Hanajiri et al. (2009), Lee et al. (2012), Vuppala et al. (2013), Wang et al. (2014) e na informação online da *European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction* (EMCDDA), na secção de Análise do *Kratom* [13, 31, 59, 62, 68]. Cruzando toda a informação dos espetros de massa apresentados nestes locais, os iões característicos escolhidos para a identificação da 7-OHMG foram o 239, o 367 e o 414 m/z, permitindo a identificação deste alcalóide nas amostras comerciais. A estrutura química da sua molécula comprova estes resultados. O tempo de retenção da 7-OHMG é de 16,993 minutos (**Figura 20**).

1.2.3. Detecção da Painanteína

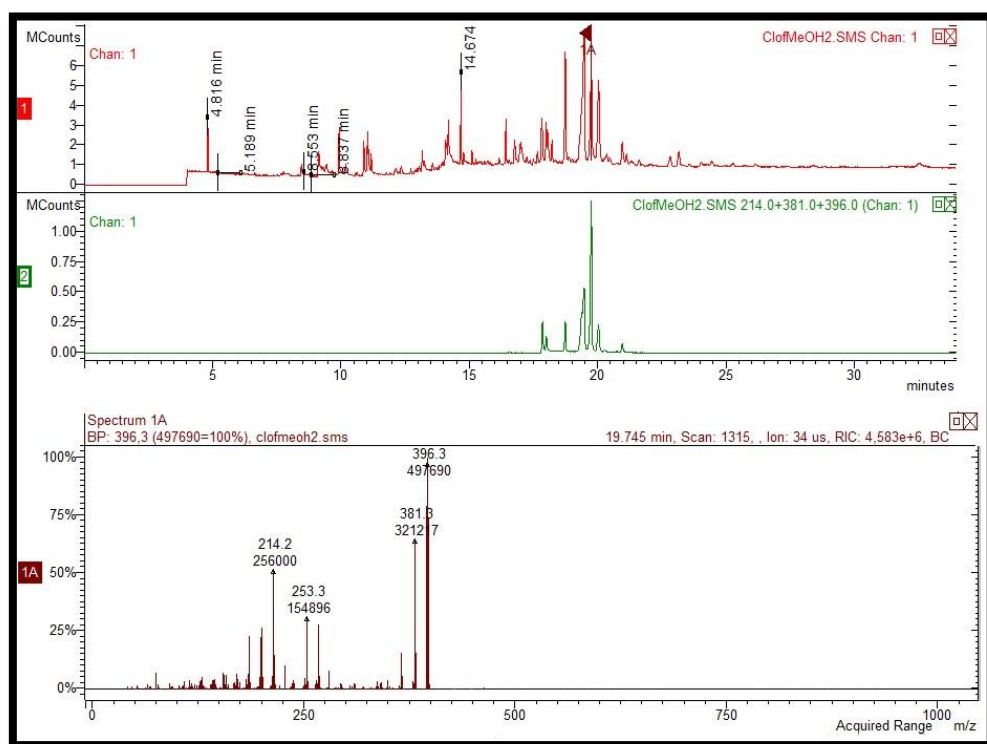


Figura 21: Cromatograma em *Full Scan* (1) e cromatograma reconstruído com os iões característicos da PAY (2) (214, 381, 396 m/z) e o seu respetivo espetro de massa (1A) do extrato Kr11BE15x de uma amostra comercial de *Kratom*.

Para a identificação da PAY, também se recorreu aos espetros de massa da literatura devido à indisponibilidade do padrão, como também do seu registo nas bibliotecas NIST05 e SWGDRUG [31]. Com a informação do espetro de massa do estudo de Wang et al. (2014), os iões escolhidos para encontrar a painanteína nos extratos das amostras comerciais de *Kratom* foram o 214, 381 e o 396 m/z. Estes iões característicos são corroborados pela estrutura química da sua molécula. O tempo de retenção deste alcalóide é de 19,745 minutos (**Figura 21**).

1.2.4. Detecção da Especiociliatina e da Especioginina

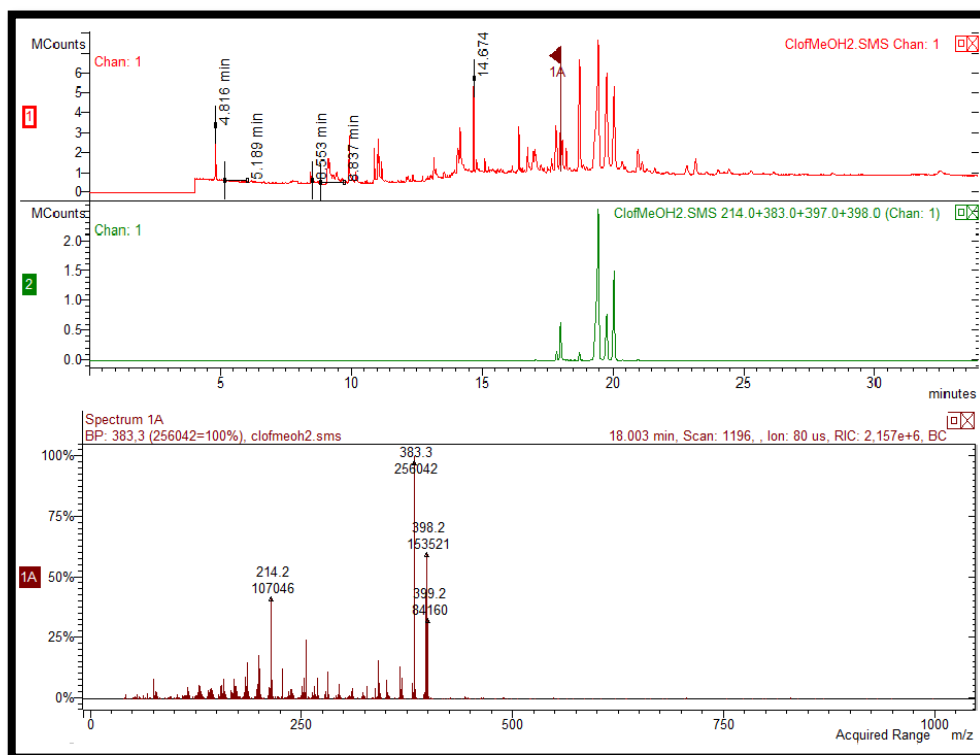


Figura 22: Cromatograma em *Full Scan* (1) e cromatograma reconstruído com os íões característicos da ESPC (2) (214, 383, 397, 398 m/z) e o seu respetivo espetro de massa (1A) do extrato Kr11BE15x de uma amostra comercial de *Kratom*.

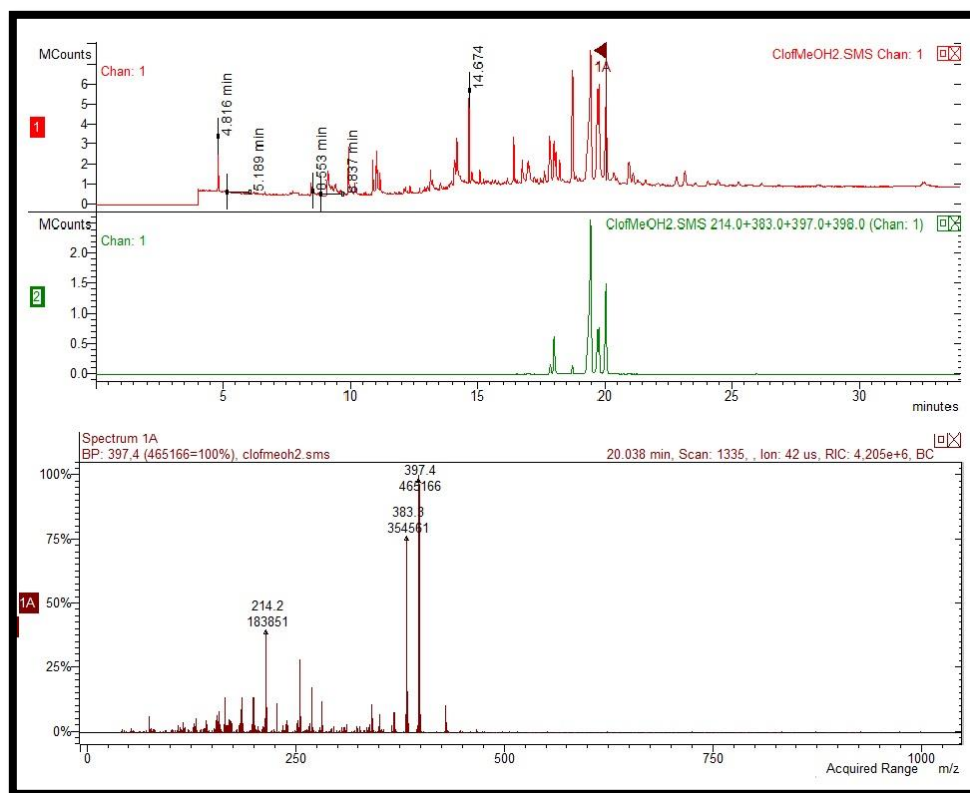


Figura 23: Cromatograma em *Full Scan* (1) e cromatograma reconstruído com os iões característicos da ESPG (2) (214, 383, 397, 398 m/z) e o seu respetivo espectro de massa (1A) no extrato Kr11BE15x de uma amostra comercial de *Kratom*.

A deteção da ESPC e da ESPG foi conseguida a partir dos espectros de massa da biblioteca NIST05 e do estudo de Wang et al. (2014) [31]. Os iões característicos que permitiram identificar estes dois alcalóides são o 214, 383, 397 e 398 m/z. As estruturas químicas das suas moléculas confirmam estes resultados. Contudo, apenas a partir dos iões característicos não seria possível a distinção entre eles. Desta forma, recorreu-se à diferença da intensidade entre o ião 383 e o 397/398 m/z nos espectros de massa para os diferenciar. No espectro da ESPC, o 383 m/z é muito mais intenso que o 397/398 m/z, enquanto no espectro da ESPG acontece exatamente o contrário, como se pode observar na **Figura 22 e 23**. Desta forma, conclui-se que o tempo de retenção da ESPC é de 18,003 minutos e o da ESPG é de 20,038 minutos. Também o cromatograma de análise por GC-MS do estudo de Wang et al. (2014) (**Figura 17**) confirma esta ordem de eluição destes alcalóides [31].

1.2.5. Detecção da Corinoxina A/B

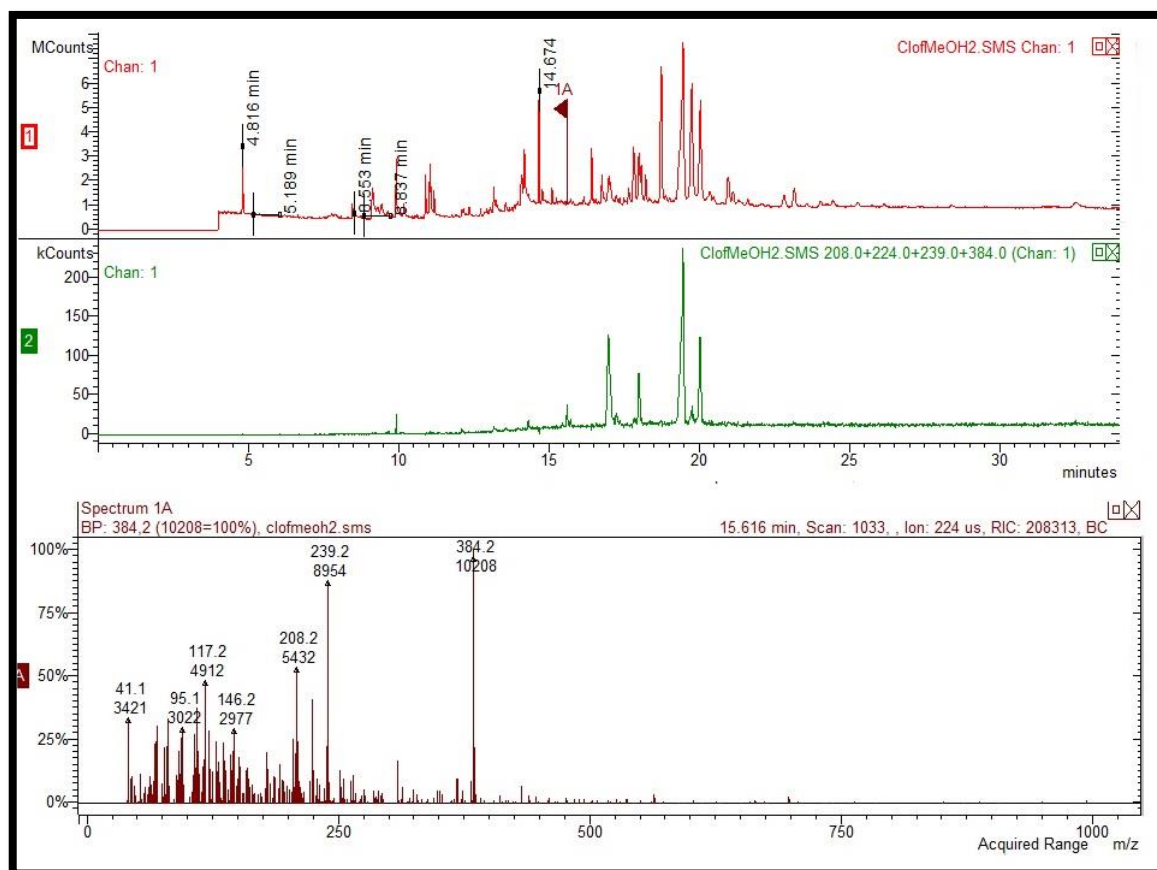


Figura 24: Cromatograma em *Full Scan* (1) e cromatograma reconstruído com os iões característicos da CORY A/B (2) (208, 224, 239 e 384 m/z) e o seu respetivo espectro de massa (1A) numa amostra comercial de *Kratom*

A identificação da CORY A/B foi feita a partir do espectro de massa da literatura devido à indisponibilidade do padrão e dos espectros de massa nas bibliotecas de espectros [31]. Wang et al. (2014) encontraram os iões 208, 224, 239 e 384 m/z para caracterizar a CORY A/B, o que permitiu a identificação do composto nos extratos das amostras comerciais. No entanto, não é possível distinguir na análise cromatográfica a CORY A da CORY B porque são diastereoisómeros, havendo a possibilidade deste pico cromatográfico corresponder a qualquer uma das duas, como foi verificado no estudo de Wang et al. (2014). O tempo de retenção da CORY A/B é de 15,616 minutos. (**Figura 24**)

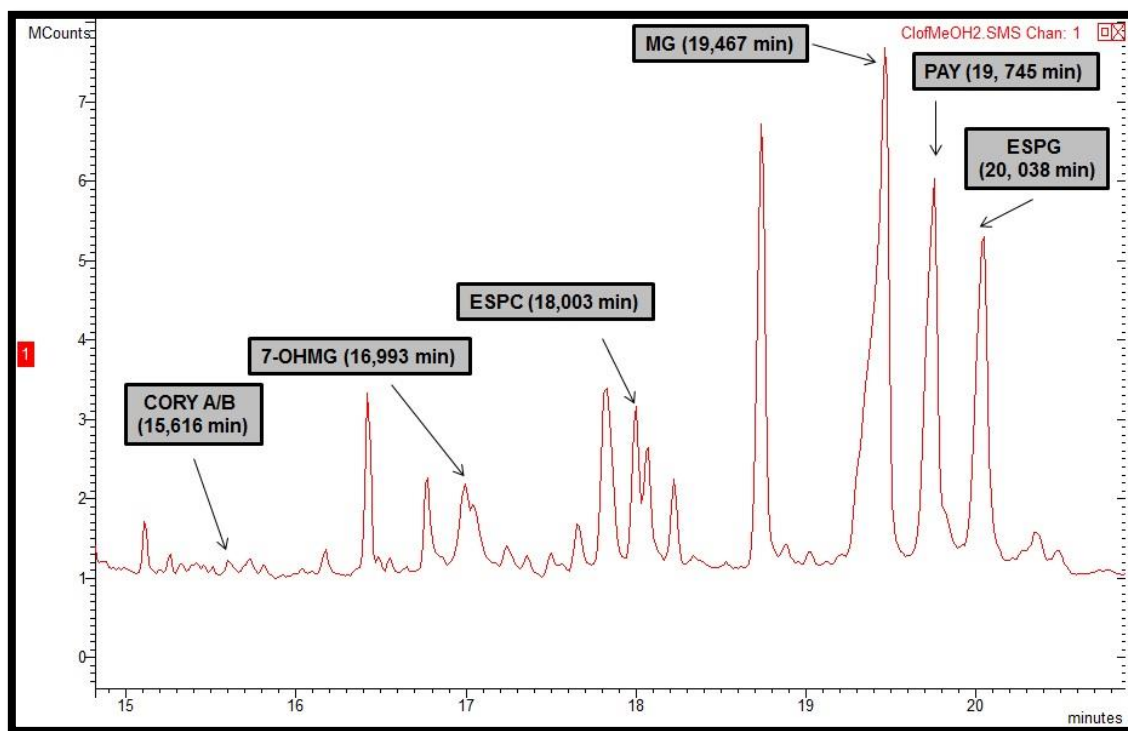


Figura 25: Cromatograma em *Full Scan* do extrato Kr11BE15x de uma amostra comercial de *Kratom*.

1.3. Seleção e Estabilidade do Padrão Interno

Neste estudo, o PI usado para a validação foi o timol, um acaricida pertencente à família dos terpenos, que também foi usado como PI na análise de amostras comerciais de outra droga natural: a *Salvia Divinorum* [141].

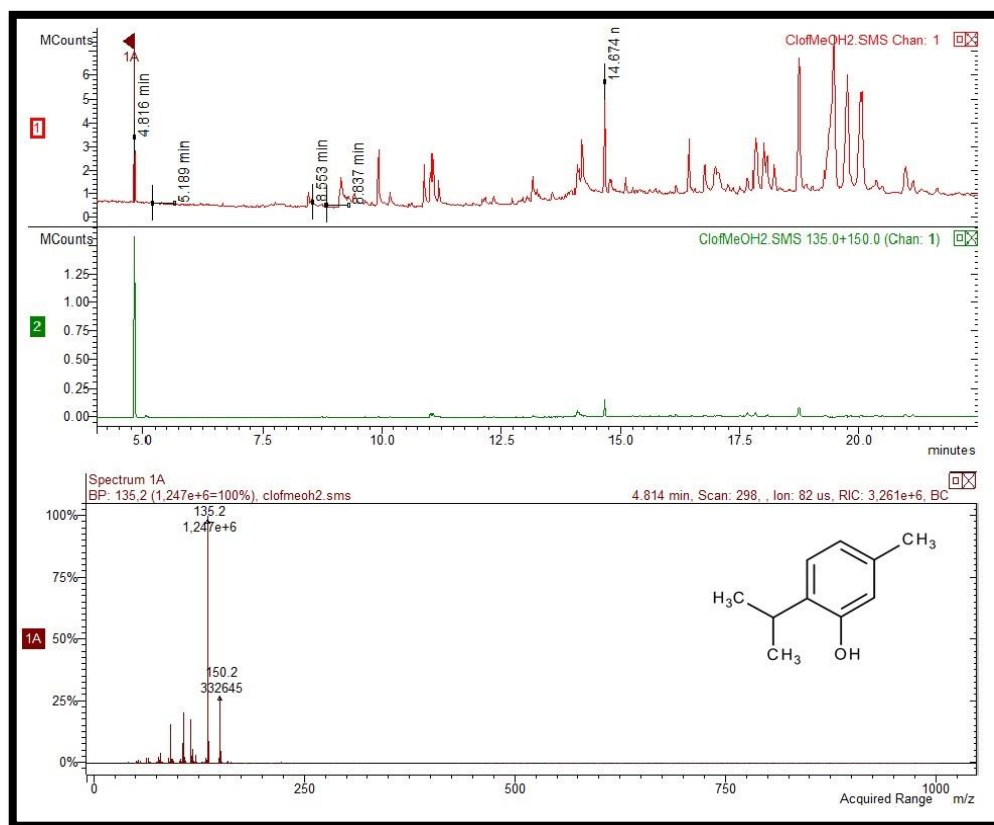


Figura 26: Cromatograma em *Full Scan* (1) e cromatograma reconstruído com os iões característicos do Timol (2) (135, 150 m/z) e o seu respetivo espetro de massa (1A) no extrato Kr11BE15x numa amostra comercial de *Kratom*.

Para além deste composto já ter sido utilizado como PI na validação de um método para deteção e quantificação de uma *smartdrug* natural em amostras comerciais, neste trabalho o timol demonstrou ter o mesmo comportamento dos analitos na extração e na análise cromatográfica, com um tempo de retenção distante dos analitos de interesse (4,814 min) (**Figura 26**). Contudo, observou-se alguma falta de reprodutibilidade nos resultados e deste modo a validação do método foi feita na ausência de padronização interna. Apesar disso, como veremos a seguir, a linearidade do método analítico foi verificada.

1.4. Validação do Método

1.4.1. Linearidade

O estudo da linearidade do método foi feito utilizando duas gamas de concentração do padrão de MG: 0 – 100 µg/mL e 0 - 750 µg/mL. A regressão linear foi obtida traçando a relação entre a área do pico do analito em função da concentração de MG, obtendo-se um R^2 de 0,9980 e 0,9978, comprovando a linearidade do método. (**Tabela 9**).

Tabela 9: Gama de concentração linear, curva de calibração e o coeficiente de correlação linear da MG

Composto	Gama de concentração linear (µg/mL)	Curva de Calibração	R ²
MG	0 - 100	y = 29391x - 78029	0,9980
	0 - 750	y = 108456x - 798085	0,9978

Devido à indisponibilidade de padrões dos análogos da MG, estas curvas de calibração foram adaptadas para a semi-quantificação dos análogos da MG nos extratos de amostras comerciais de *Kratom*, visto que têm estruturas químicas semelhantes.

1.4.2. Sensibilidade

O LOD e LOQ foram determinados utilizando os iões característicos selecionados para a MG, aumentando a sensibilidade do método. A relação do sinal-ruído para o cálculo do LOD foi estimada em 3, e para o LOQ em 10. (**Tabela 10**)

Tabela 10: LOD e LOQ para a MG com o respetivo desvio-padrão e % CV.

	Concentração (µg/mL)	Desvio- padrão	% CV
LOD	1,51	0,15	10,05
LOQ	5,03	0,41	8,21

1.4.3. Precisão

Para a determinação da precisão, foram analisadas a repetibilidade e a reprodutibilidade dos resultados do processo de extração e da análise cromatográfica da mitraginina e análogos (n=3). Na precisão *intra-day*, onde se avaliou a repetibilidade, verificou-se a proximidade das análises efetuadas nas mesmas condições e no mesmo dia com os resultados do coeficiente de variação de 0,12 a 3,31%. Na precisão *inter-day*, para a avaliação da reprodutibilidade, verificou-se a proximidade das análises efetuadas nas mesmas condições, mas em dias distintos, resultando em coeficientes de variação na ordem dos 1,74 a 17,88%. Os resultados da precisão revelam-se adequados à validação do método por serem inferiores a 20%, segundo as diretrizes da EMA [132]. (**Tabela 11**)

Tabela 11: Precisão *Intra-day* e *Inter-day* do método para a quantificação da CORY A/B, 7-OHMG, ESPC, MG, PAY e ESPG presentes nos extratos das amostras de *Kratom* analisadas (mg/g de extrato).

	Compostos	Média	Desvio-Padrão	% CV
<i>Intra-day</i>	CORY A/B	0,55	0,0006	0,12
	7-OHMG	0,58	0,002	0,30
	ESPC	0,75	0,002	0,29
	MG	2,66	0,08	3,31
	PAY	0,93	0,03	3,24
	ESPG	1,32	0,04	2,74
<i>Inter-day</i>	CORY A/B	0,56	0,01	2,43
	7-OHMG	0,59	0,01	1,74
	ESPC	0,79	0,06	7,28
	MG	3,09	0,55	17,88
	PAY	1,06	0,12	11,67
	ESPG	1,54	0,21	13,95

n=3

1.5. Quantificação da Mitraginina e Análogos nos Extratos das Amostras Comerciais de *Kratom*

Na **Tabela 12**, estão representadas a quantidade de CORY A/B, 7-OHMG, ESPC, MG, PAY e ESPG presentes em todas as amostras comerciais de *Kratom* analisadas (mg/ g de amostra). Na maioria das amostras, verificou-se que o componente maioritário é sem dúvida a MG, seguindo-se a ESPG, a PAY, e a ESPC, com a CORY A/B e a 7-OHMG sendo os compostos minoritários.

Tabela 12: Resultados da análise da CORY A/B, 7-OHMG, ESPC, MG, PAY e ESPG em extratos de amostras de *Kratom* adquiridas nas *smartshops* e pela Internet (mg/g de amostra).

CORY A/B*																			7-OHMG*						ESPC*						MG						PAY*						ESPG*					
		Média	DP	% CV	Média	DP	% CV	Média	DP	% CV	Média	DP	% CV	Média	DP	% CV	Média	DP	% CV	Média	DP	% CV	Média	DP	% CV	Média	DP	% CV	Média	DP	% CV	Média	DP	% CV														
Folhas Partidas	Kr01BF	0,55	0,0004	0,07	0,57	0,002	0,43	0,63	0,01	0,99	2,57	0,12	4,65	0,68	0,01	2,13	0,91	0,04	4,27																													
Extrato	Kr02BE15x	0,60	0,003	0,54	0,63	0,004	0,64	0,76	0,01	1,40	4,30	0,22	5,19	0,87	0,005	0,55	1,45	0,02	1,15																													
Folhas Partidas	Kr03TF	0,57	0,003	0,44	0,58	0,01	1,00	0,65	0,01	2,14	3,04	0,26	8,50	0,74	0,01	1,92	1,04	0,04	3,89																													
Extrato	Kr04TE15x	0,55	0,004	0,73	0,58	0,005	0,78	0,62	0,01	1,28	2,82	0,10	3,37	0,68	0,01	2,08	0,97	0,04	4,00																													
Folhas Partidas	Kr05TF	0,55	0,003	0,56	0,58	0,01	1,93	0,62	0,03	4,04	2,64	0,38	14,33	0,68	0,05	7,21	0,89	0,12	13,15																													
Folhas em pó	Kr06TP	0,56	0,0005	0,08	0,58	0,003	0,44	0,63	0,004	0,71	2,53	0,04	1,73	0,70	0,01	0,91	0,92	0,02	2,13																													
Folhas em pó	Kr07MP	0,55	0,001	0,22	0,58	0,004	0,75	0,63	0,003	0,40	2,58	0,15	5,72	0,73	0,01	1,15	0,98	0,02	1,98																													
Folhas Partidas	Kr08F	0,55	0,001	0,15	n.q.	-	-	0,59	0,001	0,13	0,64	0,01	2,29	0,68	0,01	1,11	0,77	0,02	2,40																													
Folhas em pó	Kr09BP	0,56	0,001	0,13	0,57	0,002	0,30	0,59	0,01	1,08	2,07	0,18	8,60	0,67	0,02	3,58	0,83	0,04	4,22																													
Resina	Kr10BR	0,61	0,02	3,96	0,60	0,02	2,60	0,56	0,01	1,42	0,83	0,14	17,39	0,56	0,01	1,86	0,58	0,02	3,59																													
Extrato	Kr11BE15x	0,55	0,001	0,12	0,58	0,002	0,30	0,75	0,002	0,29	2,66	0,09	3,31	0,93	0,03	3,24	1,32	0,04	2,74																													
Extrato	Kr12BEg	88,60	2,65	2,99	57,73	0,58	1,00	60,26	0,40	0,66	187,40	16,72	8,92	61,82	0,66	1,07	69,57	1,64	2,35																													
Extrato	Kr13BEr25x	0,59	0,003	0,57	0,60	0,00	0,62	0,62	0,01	1,31	2,70	0,20	7,28	0,70	0,01	1,48	0,90	0,03	3,54																													

* Concentrações calculadas a partir das curvas de calibração da MG; n.q.= Não Quantificado (< LOQ)

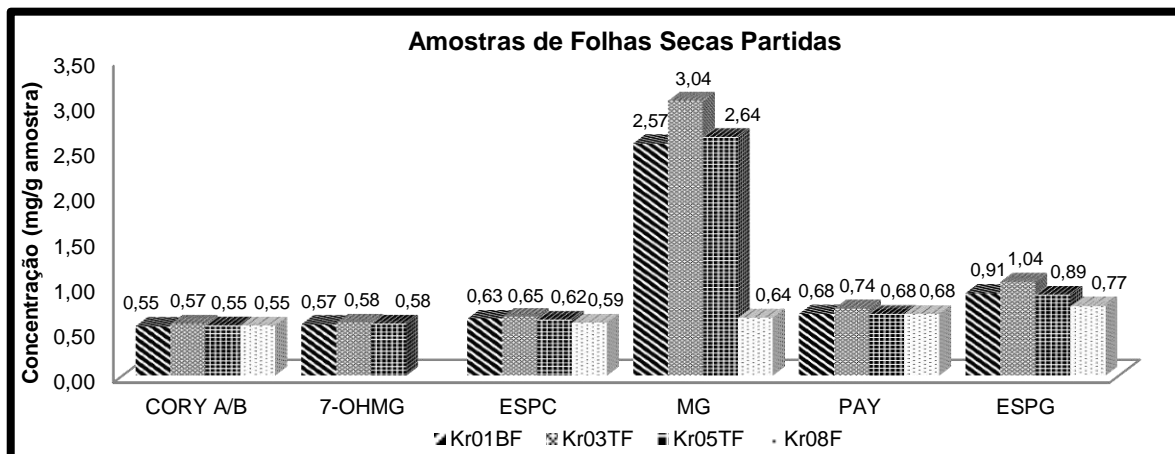


Figura 27: Concentração da CORY A/B, 7-OHMG, ESPC, MG, PAY e ESPG nos extratos das amostras comerciais de *Kratom* do tipo folhas secas partidas (Kr01BF, Kr03TF, Kr05TF, Kr08F).

Os extratos das amostras comerciais de *Kratom* do tipo folhas secas partidas exibem uma maior concentração de MG em relação aos seus análogos. Comparando a concentração deste alcalóide nestes extratos, verifica-se que o extrato da amostra Kr08F, de origem desconhecida, é o extrato que apresenta uma concentração de MG menor em relação às outras, apesar da sua concentração de análogos ser semelhante às restantes amostras. Os outros extratos analisados das amostras Kr01BF, Kr03TF e Kr05TF contêm uma quantidade de MG e análogos semelhantes entre si. (**Figura 27; Tabela 12**)

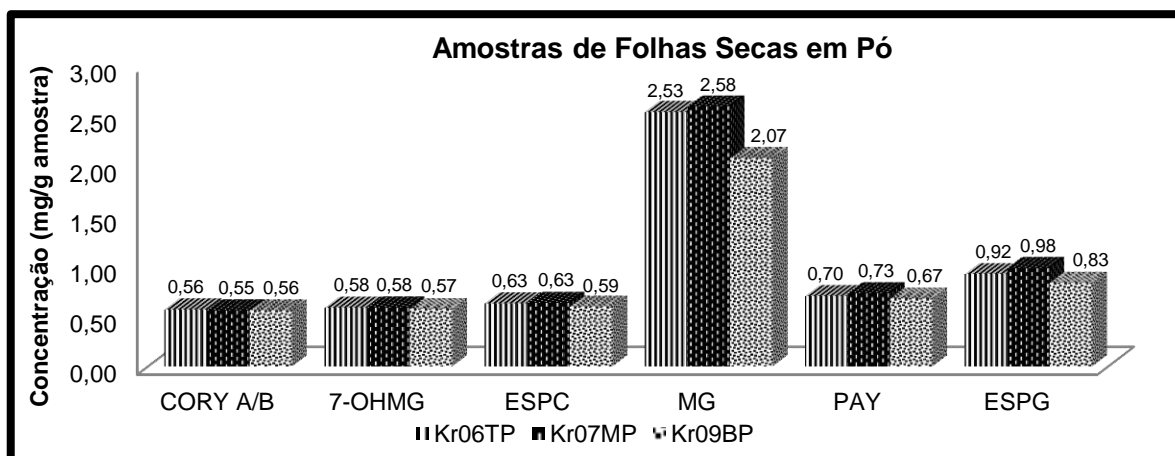


Figura 28: Concentração da CORY A/B, 7-OHMG, ESPC, MG, PAY e ESPG nas amostras comerciais de *Kratom* do tipo folhas secas em pó (Kr06TP, Kr07MP, Kr09BP)

Tal como se observou nos extratos das amostras de folhas secas partidas, nos extratos das amostras de folhas secas em pó, a quantidade de MG é superior em todos em relação aos análogos. Contudo, a quantidade de MG, como também a concentração

de análogos é semelhante entre todos os extratos deste tipo de amostra. (Figura 28; Tabela 12)

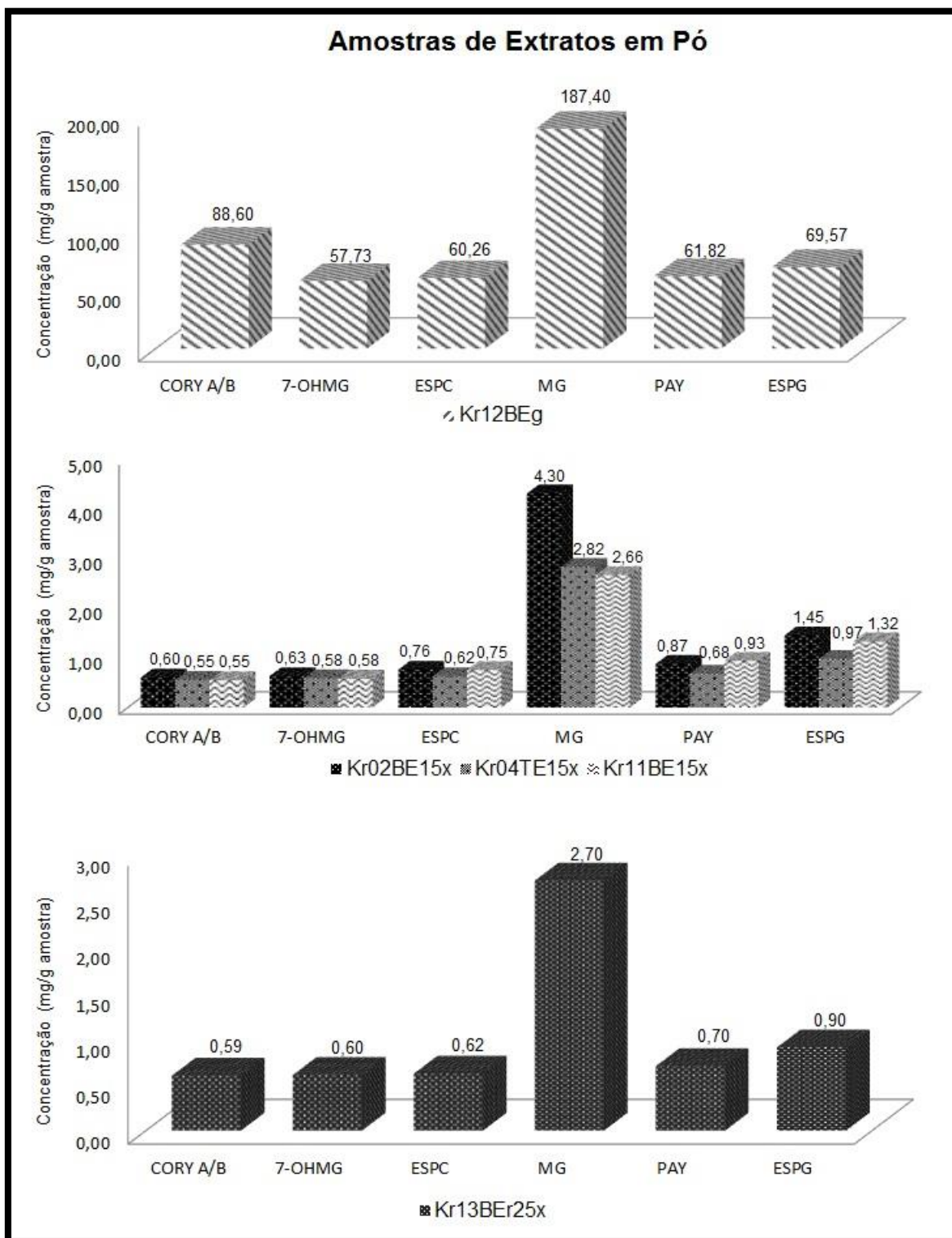


Figura 29: Concentração da CORY A/B, 7-OHMG, ESPC, MG, PAY e ESPG numa amostra comercial de *Kratom* do tipo extrato em pó (Kr12BEg).

Em todos os extratos de amostras do tipo “extratos em pó” analisados exibem uma maior concentração de MG. O extrato Kr12BEg analisado foi o que exibiu uma concentração de MG e análogos maior do que todos os outros extratos de amostras deste tipo, sendo esta cerca de 50 vezes superior. A este extrato, em relação à MG, segue-se o Kr02BE15x, dos extratos das amostras 15x, e os Kr04TE15x , Kr11BE15x (extratos 15x) e Kr13BEr25x (extrato 25x) com concentrações semelhantes. A MG no extrato 25x em pó, apresenta uma concentração semelhante a dois dos extratos 15x (Kr04TE15x e Kr11BE15x). O extrato da amostra Kr02BE15x, proveniente de Bali, exibiu a maior concentração de MG, comparativamente aos restantes extratos 15x estudados. Contudo, o outro extrato 15x com a mesma origem (Kr11BE15x) apresentou uma concentração de MG bastante inferior, embora as concentrações dos outros alcalóides estivessem próximas das do extrato da amostra Kr02BE15x. (**Figura 29; Tabela 12**)

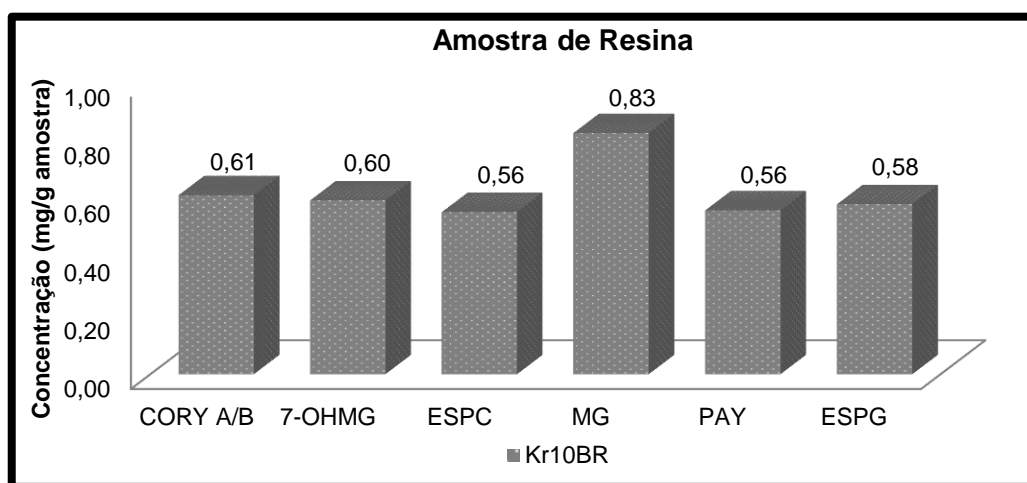


Figura 30: Concentração da CORY A/B, 7-OHMG, ESPC, MG, PAY e ESPG numa amostra comercial de *Kratom* do tipo resina (Kr10BR).

Na amostra de resina, todos os alcalóides presentes estão em quantidades muito semelhantes, não havendo uma diferença entre a concentração de MG e os outros compostos. (**Figura 30; Tabela 12**).

2. Citotoxicidade do Padrão Mitraginina e de Extratos de Amostras Comerciais de *Kratom* nas linhas celulares Caco-2 e SH-SY5Y

2.1. Análise Morfológica por Microscopia de Contraste de Fase

As células Caco-2 e SH-SY5Y foram observadas por microscopia de contraste de fase, após 24 h de incubação com o padrão de mitraginina (MG-P) e com extratos das amostras comerciais de *Kratom*, para investigar possíveis alterações na sua morfologia. Como apresentado na **Figura 31 e 32**, não foram observadas alterações morfológicas significativas em relação ao controlo (células não-expostas). Contudo, a partir da concentração intermédia (10 µg/mL) de MG-P e das amostras, observa-se a formação de agregados celulares, havendo mesmo a perda da integridade da monocamada na concentração mais elevada testada (60 µg/mL) em ambos os modelos *in vitro*.

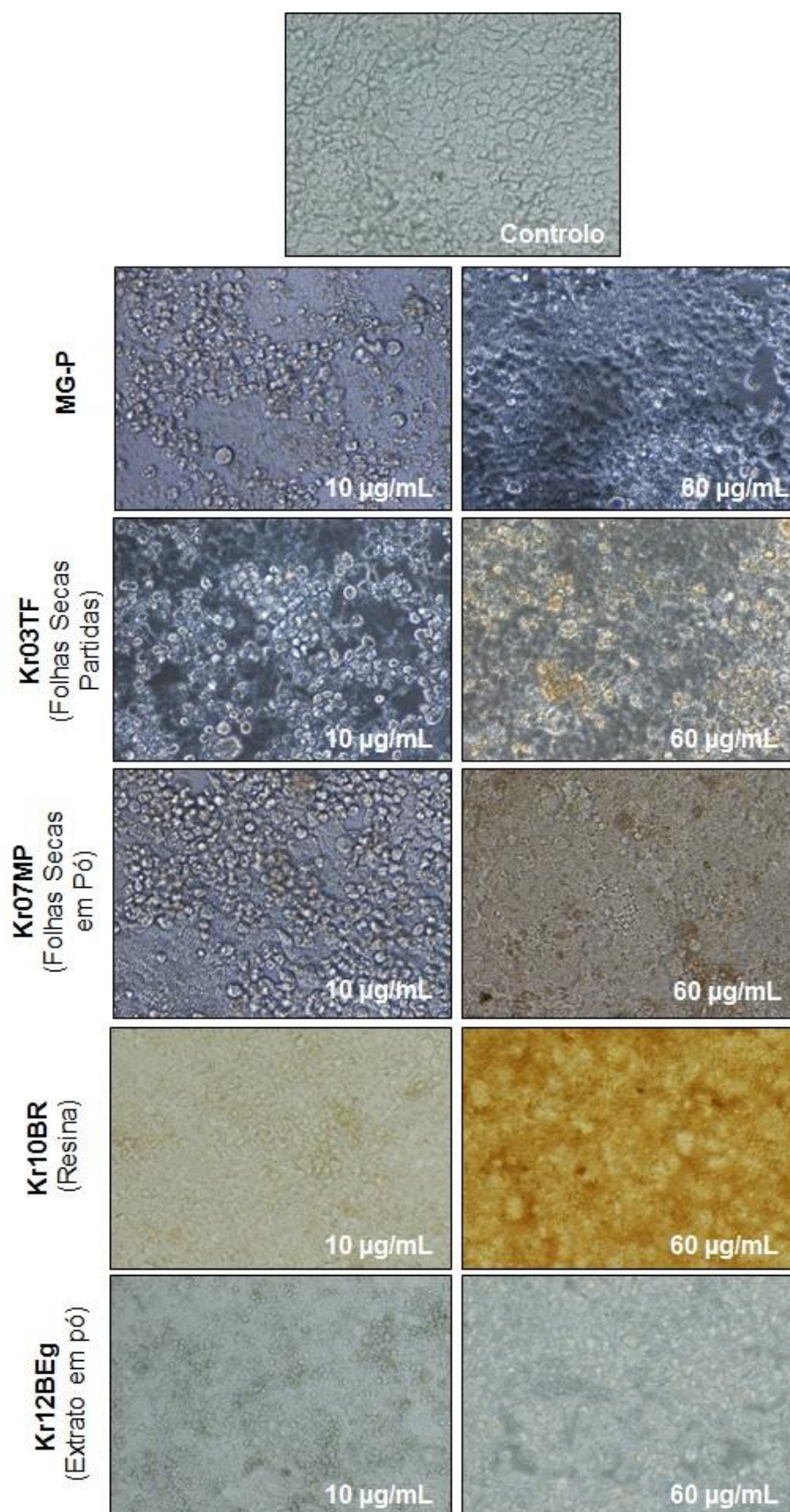


Figura 31: Imagens representativas de microscopia de contraste de fase de células Caco-2 expostas durante 24 h ao MG-P e a alguns extratos das amostras comerciais de *Kratom* (Kr03TF, Kr07MP, Kr12BEg e Kr10BR): controlo, 10 µg/mL e 60 µg/mL (ampliação 200x).

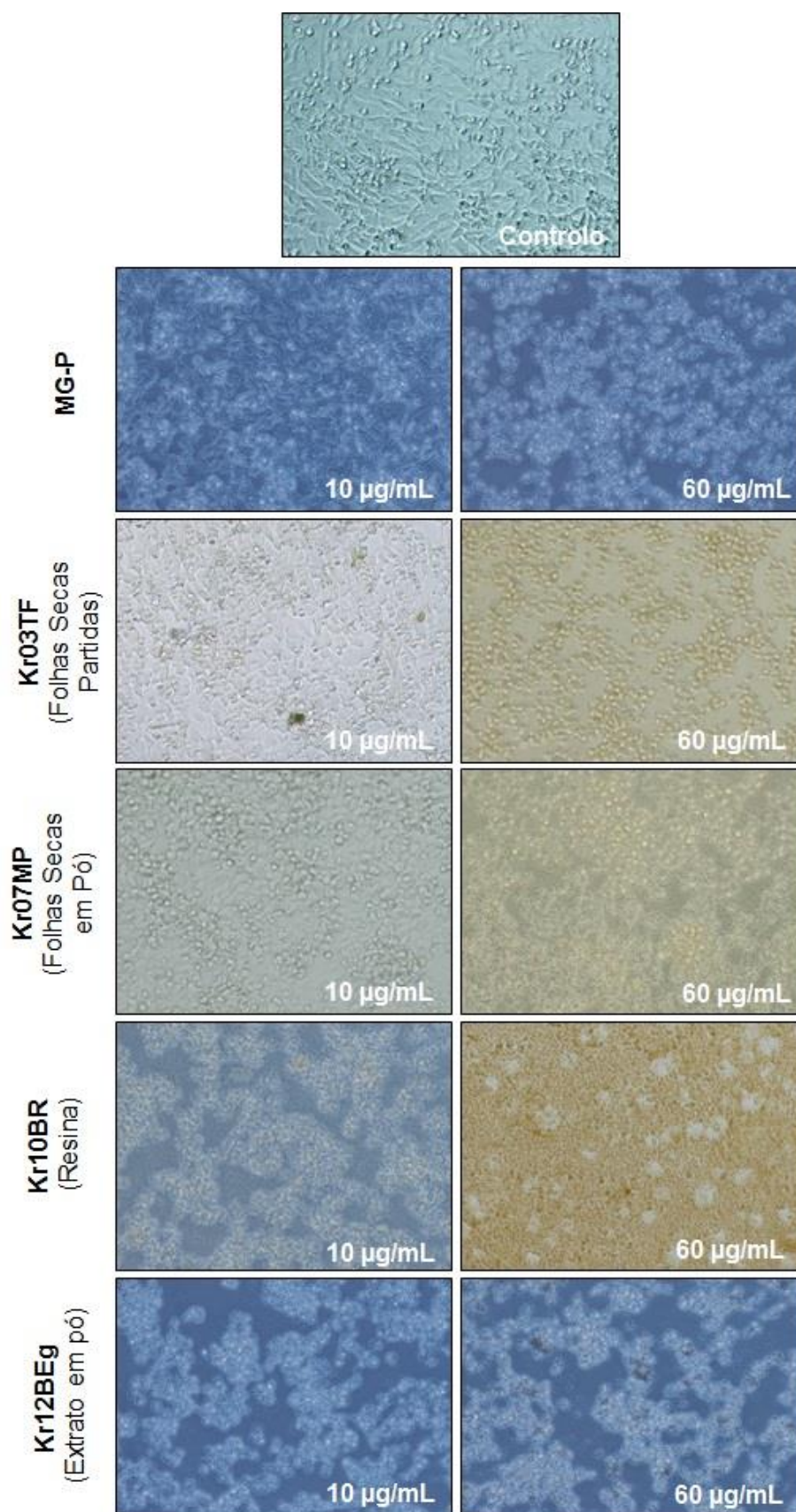


Figura 32: Imagens representativas de microscopia de contraste de fase de células SH-SY5Y expostas durante 24 h ao MG-P e a alguns extratos das amostras comerciais de *Kratom* (Kr03TF, Kr07MP, Kr12BEg e Kr10BR): controlo, 10 µg/mL e 60 µg/mL (ampliação 200x).

2.2. Efeitos Citotóxicos

A citotoxicidade induzida pelo MG-P e pelos extratos das amostras comerciais de *Kratom*, foi determinada após 6 e 24 horas de exposição, através da avaliação da viabilidade celular, pelos ensaios da captação do Vermelho Neutro (NR) e de redução do MTT.

2.2.1. Determinação do IC₅₀

A partir do efeito do MG-P e dos extratos das amostras comerciais de *Kratom* sobre a viabilidade celular, avaliado a partir do ensaio de redução do MTT e do ensaio de captação do vermelho neutro, após 6 e 24 h de exposição a diferentes concentrações dos referidos compostos, foi possível traçar as respectivas curvas de concentração-resposta. É de notar que foram efetuadas três experiências nos ensaios NR e apenas uma no ensaio MTT, visto que este último auxiliou apenas para confirmação dos resultados obtidos com o ensaio de captação do vermelho neutro.

Na exposição de ambas as linhas celulares à MG-P e à maioria dos extratos das amostras comerciais de *Kratom* observa-se uma diferença significativa da viabilidade celular entre as 6 e 24 h de exposição, nos diferentes ensaios efetuados. (**Figura 33 – 42**) Contudo, os extratos das amostras Kr03TF, Kr07MP e Kr12BEg não apresentam diferenças significativas entre as 6 e 24 h de exposição às células SH-SY5Y, no ensaio de redução do MTT. Este mesmo resultado foi observado para o ensaio de captação do vermelho neutro nos extratos das amostras Kr02BE15x, Kr05TF e Kr06TP. Nas células Caco-2, no ensaio de redução do MTT, a sua exposição aos extratos das amostras Kr01BF e Kr05TF também não se observa diferenças significativas entre as 6 e 24 h, apresentando ambos os períodos de exposição a mesma citotoxicidade nestes extratos. Em ambos os ensaios, não se verificou qualquer alteração na viabilidade nas células Caco-2 e SH-SY5Y quando estas foram expostas, durante 6 e 24 horas, ao veículo (6% MeOH; resultados não apresentados).

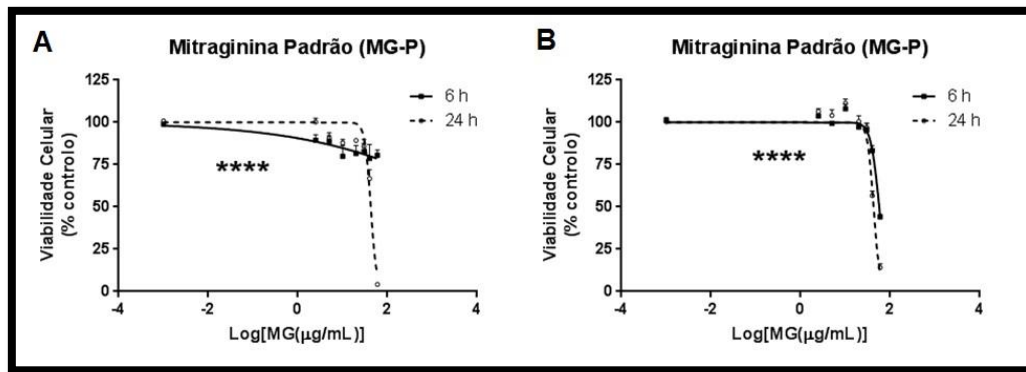


Figura 33: Efeito da mitraginina padrão (MG-P) sobre a viabilidade celular das células Caco-2 (A) e SH-SY5Y (B), avaliado pelo ensaio da captação do vermelho neutro, após 6 e 24 h de exposição a diferentes concentrações (0-60 $\mu\text{g/mL}$) do referido composto. Os dados encontram-se apresentados como média \pm SEM ($n=3$, em 3 experiências independentes). As curvas concentração-resposta foram obtidas usando o método dos mínimos quadrados (*least squares*) e a comparação entre as curvas foi feita usando o teste F (*extra sum-of-squares F-test*). **** $P < 0,0001$

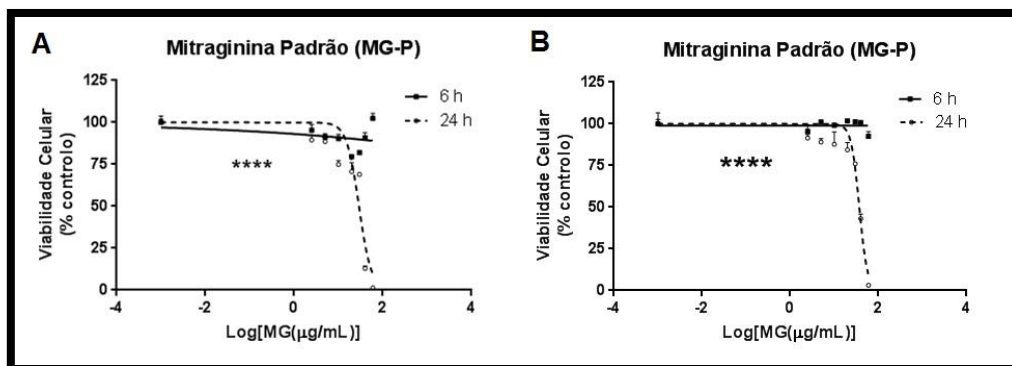


Figura 34: Efeito da mitraginina padrão (MP-G) sobre a viabilidade celular das células Caco-2 (A) e SH-SY5Y (B), avaliado pelo ensaio da redução do MTT, após 6 e 24 horas de exposição a diferentes concentrações (0-60 $\mu\text{g/mL}$) do referido composto. Os dados encontram-se apresentados como média \pm SEM ($n=3$, em 1 experiência). As curvas concentração-resposta foram obtidas usando o método dos mínimos quadrados (*least squares*) e a comparação entre as curvas foi feita usando o teste F (*extra sum-of-squares F-test*). **** $P < 0,0001$

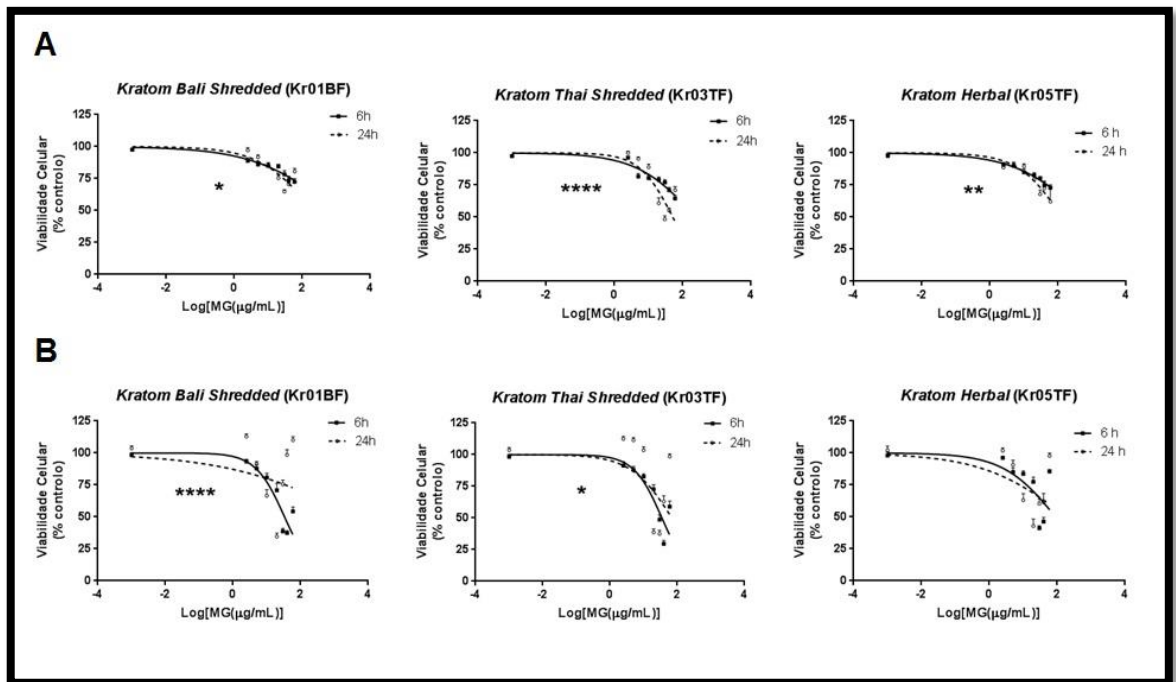


Figura 35: Efeito dos extratos das amostras comerciais de *Kratom* do tipo folhas secas partidas sobre a viabilidade celular das células Caco-2 (A) e SH-SY5Y (B), avaliado pelo ensaio da captação do vermelho neutro, após 6 e 24 horas de exposição a diferentes concentrações (0-60 µg/mL) do referido composto. Os dados encontram-se apresentados como média \pm SEM (n=3, em 3 experiências independentes). As curvas concentração-resposta foram obtidas usando o método dos mínimos quadrados (*least squares*) e a comparação entre as curvas foi feita usando o teste F (*extra sum-of-squares F-test*). *P < 0,05; **P < 0,01; ****P < 0,0001

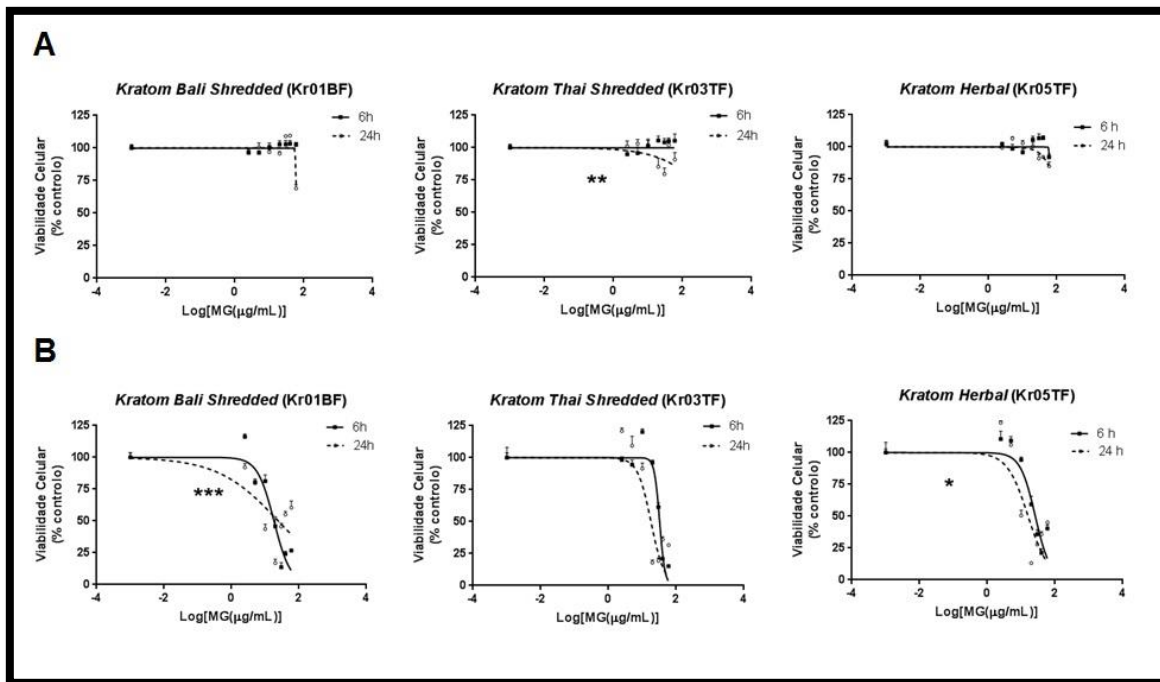


Figura 36: Efeito dos extratos das amostras comerciais de *Kratom* do tipo folhas secas partidas sobre a viabilidade celular das células Caco-2 (A) e SH-SY5Y (B), avaliado pelo ensaio da redução do MTT, após 6 e 24 horas de exposição a diferentes concentrações (0-60 µg/mL) do referido composto. Os dados encontram-se apresentados como média \pm SEM (n=3, em 1 experiência). As curvas concentração-resposta foram obtidas usando o método dos mínimos quadrados (*least squares*) e a comparação entre as curvas foi feita usando o teste F (*extra sum-of-squares F-test*). *P < 0,05; **P < 0,01; ***P < 0,001

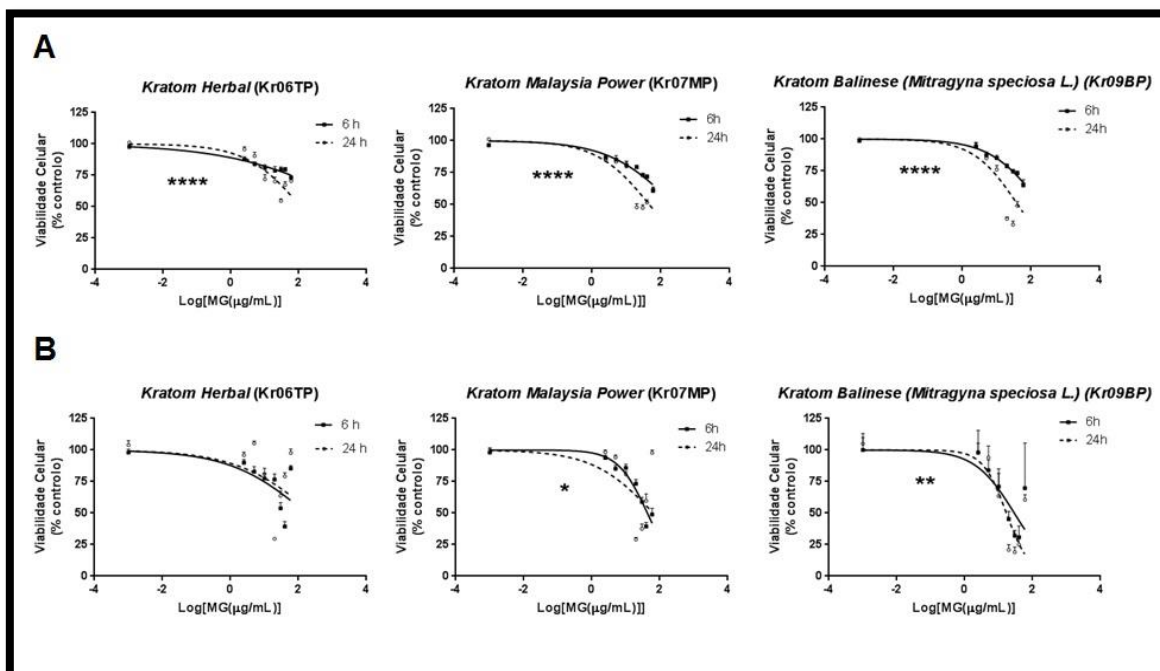


Figura 37: Efeito dos extratos das amostras comerciais de *Kratom* do tipo folhas secas em pó sobre a viabilidade celular das células Caco-2 (A) e SH-SY5Y (B), avaliado pelo ensaio da captação do vermelho neutro, após 6 e 24 horas de exposição a diferentes concentrações (0-60 µg/mL) do referido composto. Os

dados encontram-se apresentados como média \pm SEM (n=3, em 3 experiências independentes). As curvas concentração-resposta foram obtidas usando o método dos mínimos quadrados (*least squares*) e a comparação entre as curvas foi feita usando o teste F (*extra sum-of-squares F-test*). *P < 0,05; **P < 0,01; ****P < 0,0001

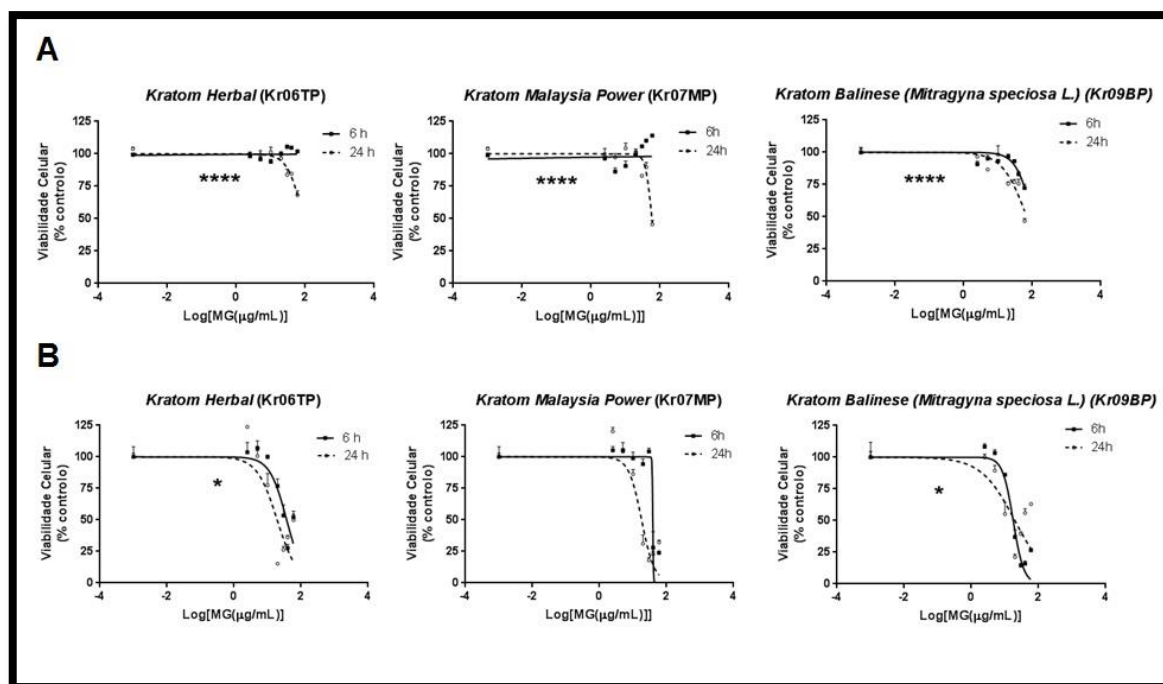


Figura 38: Efeito dos extratos das amostras comerciais de *Kratom* do tipo folhas secas em pó sobre a viabilidade celular das células Caco-2 (A) e SH-SY5Y (B), avaliado pelo ensaio da redução do MTT, após 6 e 24 horas de exposição a diferentes concentrações (0-60 μ g/mL) do referido composto. Os dados encontram-se apresentados como média \pm SEM (n=3, em 1 experiência). As curvas concentração-resposta foram obtidas usando o método dos mínimos quadrados (*least squares*) e a comparação entre as curvas foi feita usando o teste F (*extra sum-of-squares F-test*). *P < 0,05; ****P < 0,0001

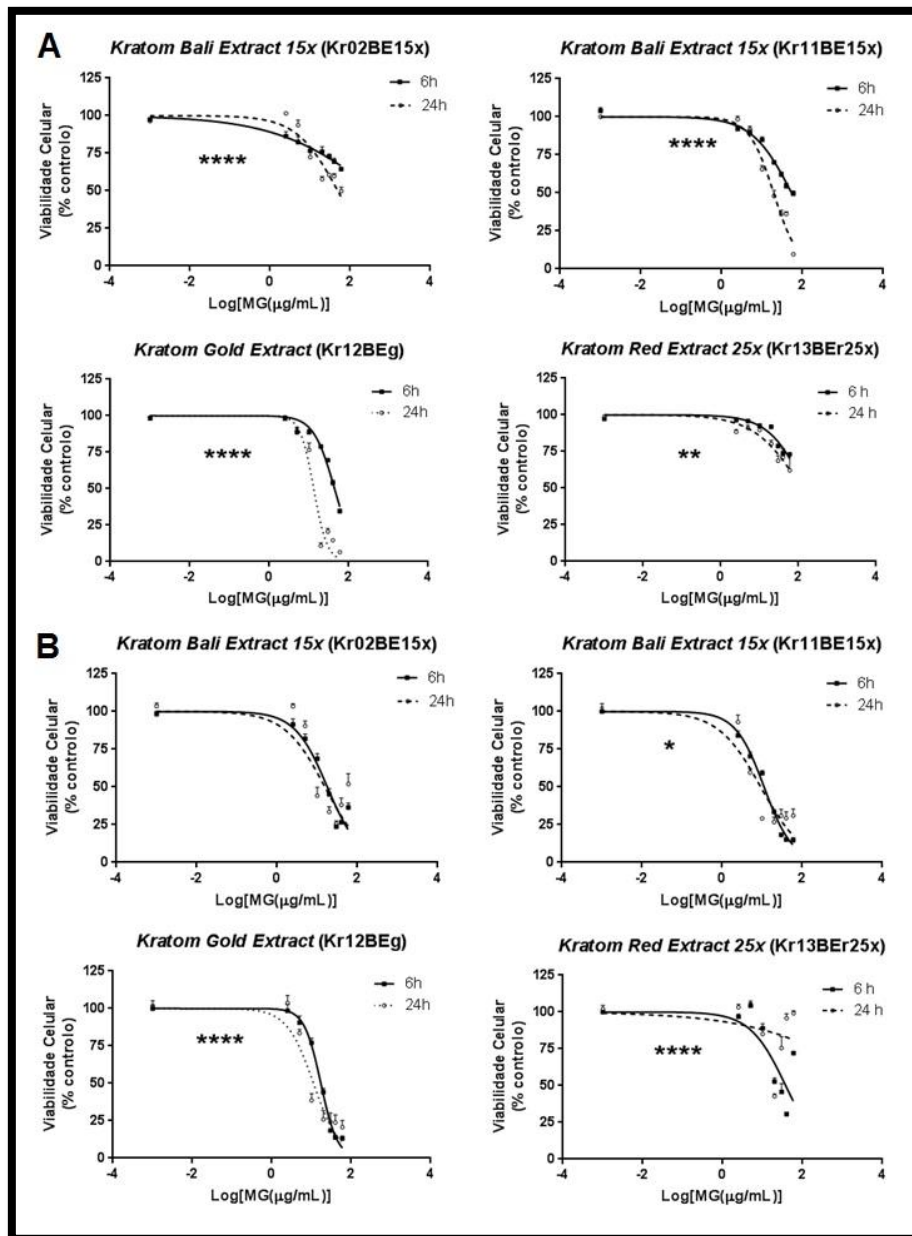


Figura 39: Efeito dos extratos das amostras comerciais de *Kratom* do tipo extratos em pó sobre a viabilidade celular das células Caco-2 (A) e SH-SY5Y (B), avaliado pelo ensaio da captação do vermelho neutro, após 6 e 24 horas de exposição a diferentes concentrações (0-60 µg/mL) do referido composto. Os dados encontram-se apresentados como média ± SEM (n=3, em 3 experiências independentes). As curvas concentração-resposta foram obtidas usando o método dos mínimos quadrados (*least squares*) e a comparação entre as curvas foi feita usando o teste F (*extra sum-of-squares F-test*). **P < 0,01; ****P < 0,0001

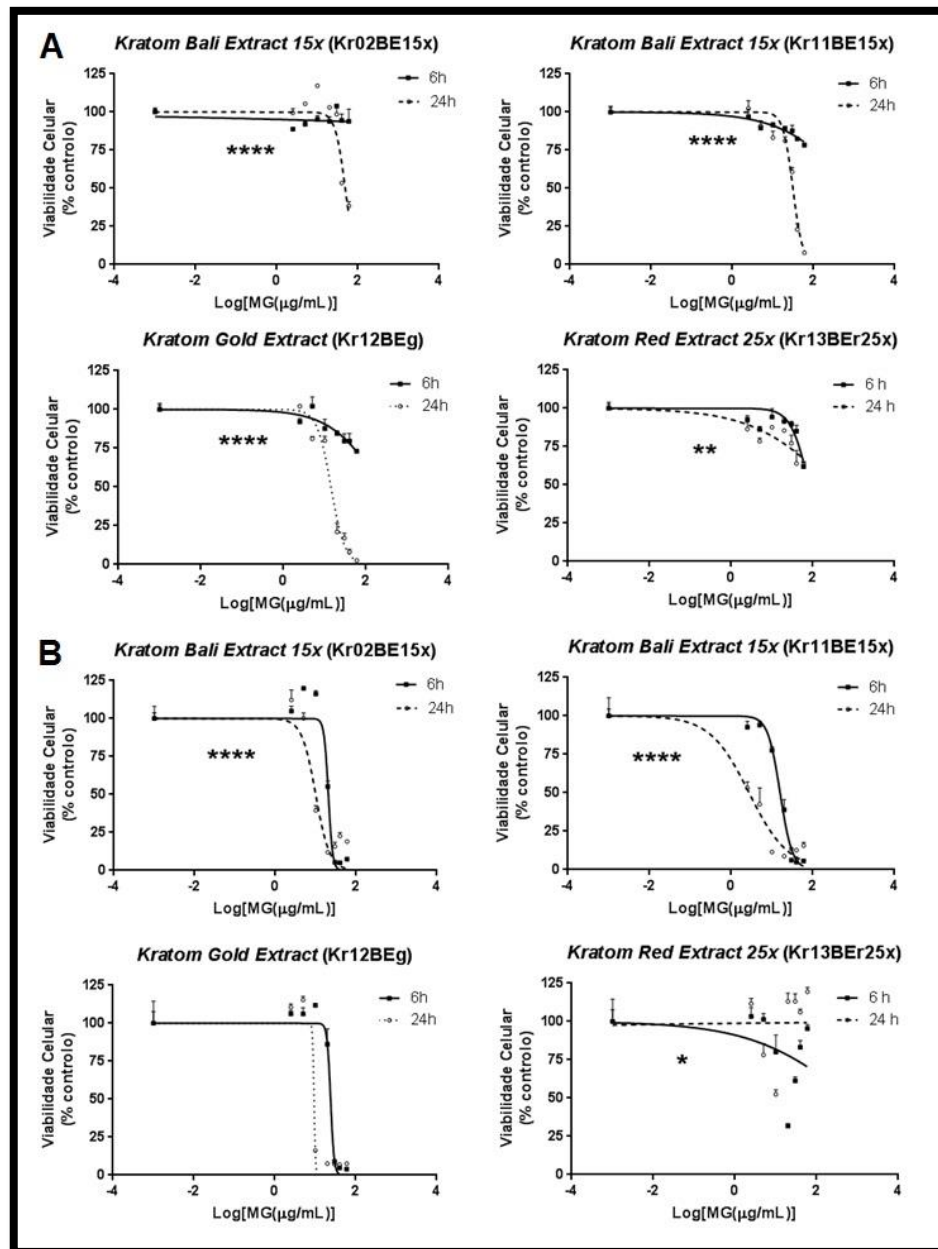


Figura 40: Efeito dos extratos das amostras comerciais de *Kratom* do tipo extratos em pó sobre a viabilidade celular das células Caco-2 (A) e SH-SY5Y (B), avaliado pelo ensaio da redução do MTT, após 6 e 24 horas de exposição a diferentes concentrações (0-60 µg/mL) do referido composto. Os dados encontram-se apresentados como média \pm SEM ($n=3$, em 1 experiência). As curvas concentração-resposta foram obtidas usando o método dos mínimos quadrados (*least squares*) e a comparação entre as curvas foi feita usando o teste F (*extra sum-of-squares F-test*). * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; **** $P < 0,0001$

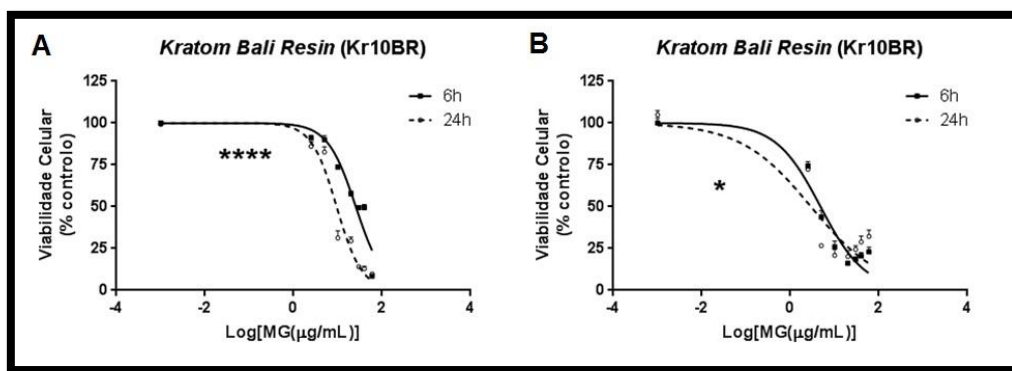


Figura 41: Efeito dos extratos das amostras comerciais de *Kratom* do tipo resina sobre a viabilidade celular das células Caco-2 (A) e SH-SY5Y (B), avaliado pelo ensaio da captação do vermelho neutro, após 6 e 24 horas de exposição a diferentes concentrações (0-60 µg/mL) do referido composto. Os dados encontram-se apresentados como média \pm SEM (n=3, em 3 experiências independentes). As curvas concentração-resposta foram obtidas usando o método dos mínimos quadrados (*least squares*) e a comparação entre as curvas foi feita usando o teste F (*extra sum-of-squares F-test*). *P < 0,05; ****P < 0,0001

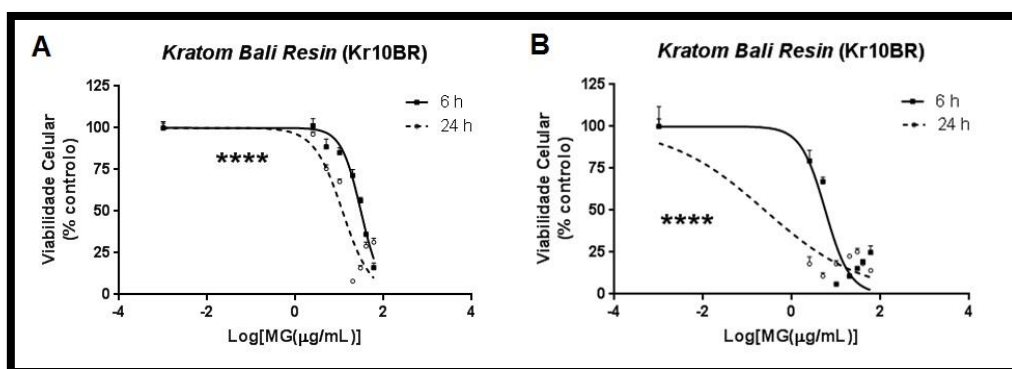


Figura 42: Efeito dos extratos das amostras comerciais de *Kratom* do tipo resina sobre a viabilidade celular das células Caco-2 (A) e SH-SY5Y (B), avaliado pelo ensaio da redução do MTT, após 6 e 24 horas de exposição a diferentes concentrações (0-60 µg/mL) do referido composto. Os dados encontram-se apresentados como média \pm SEM (n=3, em 1 experiência). As curvas concentração-resposta foram obtidas usando o método dos mínimos quadrados (*least squares*) e a comparação entre as curvas foi feita usando o teste F (*extra sum-of-squares F-test*). ****P < 0,0001

Na **Tabela 13**, estão registrados os valores de IC_{50} obtidos nos ensaios de redução do MTT e captação do vermelho neutro para as células Caco-2 e SH-SY5Y quando expostas à MG-P e aos extratos das amostras comerciais de *Kratom* durante 24 h. Em ambos os modelos *in vitro*, observa-se que o extrato da amostra Kr10BR é o que apresenta a maior toxicidade, registrando os valores de IC_{50} mais baixos de todos. A este extrato seguem-se os restantes que pertencem também a este tipo de amostra: o Kr12BEg e o Kr11BE15x, sendo que o primeiro revelou-se mais citotóxico para as Caco-2 e o segundo para as SH-SY5Y. A MG-P revelou-se menos tóxica que estes extratos. Relativamente à toxicidade dos restantes extratos, onde foi permitido o cálculo de

valores de IC_{50} , nota-se diferenças entre ensaios e entre as duas linhas celulares. Nas células Caco-2, o extrato da amostra Kr09BP, estando incluído nas amostras de folhas em pó, também mostrou uma toxicidade superior à MG-P no ensaio de captação do vermelho neutro. Por outro lado, a MG-P mostrou-se mais tóxica que o extrato da amostra Kr02BE15x neste modelo celular, em ambos os ensaios realizados. Nas células SH-SY5Y, os extratos das amostras Kr02BE15x e Kr09BP também demonstraram maior citotoxicidade que a MG-P. No ensaio de redução de MTT nesta linha celular, a maioria das amostras testadas mostrou uma toxicidade superior a este alcalóide, apesar de este mesmo resultado não se verificar no ensaio de captação do vermelho neutro. É de salientar que o facto de ter sido realizado apenas um ensaio de MTT pode ter alguma influência nestes resultados obtidos. Ainda relativamente às discrepâncias entre estes ensaios, denota-se que para as células Caco-2, a maioria das amostras apresenta valores de IC_{50} inferiores para o ensaio NR, o que significa que este ensaio pode ter uma maior sensibilidade para esta avaliação de citotoxicidade nesta linha. Pelo contrário, nas células SH-SY5Y, a partir do ensaio MTT resultaram os valores de IC_{50} inferiores, o que indica ser este o ensaio mais sensível. Mais uma vez, o número de experiências do ensaio NR ser bastante superior ao número de ensaios MTT pode afetar estes resultados.

Tabela 13: Valores de IC₅₀ obtidos após 24h de exposição das células Caco-2 e SH-SY5Y ao MG-P e a extratos de amostras comerciais de *Kratom*.

Citotoxicidade IC ₅₀ (µg/mL) Intervalo de Confiança 95%				
Amostra	Caco-2		SH-SY5Y	
	Ensaio NR	Ensaio MTT	Ensaio NR	Ensaio MTT
MG-P	42,51 41,04 - 44,04	29,14 25,07 - 33,68	42,64 41,21 - 44,13	37,10 34,24 - 40,20
Kr01BF	-	-	-	24,44* 10,88 - 54,91
Kr02BE15x	49,03 40,60 - 59,20	48,67 44,66 - 53,04	15,57* 12,22 - 19,84	10,00* 7,90 - 12,67
Kr03TF	-	-	-	13,39* 24,30 - 18,04
Kr05TF	-	-	-	16,07* 10,53 - 24,52
Kr06TP	-	-	-	19,43* 12,91 - 29,25
Kr07MP	46,34 35,60 - 60,36	-	-	18,11* 14,38 - 22,81
Kr09BP	37,55 28,78 - 48,99	-	16,95* 13,69 - 20,99	19,81* 11,17 - 35,12
Kr10BR	9,43* 8,50 - 10,47	11,68* 8,339 - 16,35	2,93* 1,80 - 4,78	0,25* 0,01 - 1,10
Kr11BE15x	19,41* 18,02 - 20,91	31,15 28,63 - 33,90	9,22* 7,28 - 11,68	2,75* 1,73 - 4,36
Kr12BEg	13,17* 12,13 - 14,29	14,19* 12,67 - 15, 92	11,23* 9,30 - 13,57	9,35* 8,88 - 10,82
Kr13BEr25x	-	-	-	-

As curvas concentração-resposta foram obtidas usando o método dos mínimos quadrados (*least squares*) e a comparação entre as curvas foi feita usando o teste F (*extra sum-of-squares F-test*). *P < 0,0001 vs MG-P

2.3. Genotoxicidade

A potencial genotoxicidade induzida pelo MG-P e pelos extratos de 3 amostras comerciais de *Kratom* nas células de epitélio intestinal humano Caco-2, foi avaliada após 24 h de exposição aos referidos compostos, através da avaliação do dano no DNA pelo ensaio cometa. Neste ensaio resultam estruturas semelhantes a cometas, que são passíveis de visualização por microscopia de fluorescência, e onde são medidos parâmetros que refletem o dano no DNA, nomeadamente a percentagem da intensidade da cauda (% *tail intensity*) e o *olive tail moment*.

Na **Tabela 14**, estão representados os resultados respeitantes ao dano no DNA causado pela exposição das células Caco-2 ao MG-P e aos extratos das amostras comerciais de *Kratom* mais consumidas e/ou que apresentaram maior citotoxicidade nos ensaio de viabilidade celular e integridade lisossomal, durante 24 h. Pela análise da tabela é possível verificar que não se observaram alterações significativas dos parâmetros de dano de DNA medidos quando as células foram expostas ao MG-P em comparação com o controlo. Pelo contrário, todos os extratos das amostras comerciais de *Kratom* testados induziram genotoxicidade. No extrato Kr11BE15x, o dano observado foi significativo nas duas concentrações testadas e nos dois parâmetros. Os extratos Kr10BR e Kr12BEg também se demonstraram genotóxicos, embora os resultados apenas sejam significativos na maior concentração testada para os dois parâmetros. As células tratadas com o veículo (MeOH 0,5%) não apresentaram quaisquer sinais de danos no DNA. Na exposição das células ao controlo positivo (MMS 500 µM), durante 1h, nota-se um aumento significativo da genotoxicidade em relação às células não-expostas.

Tabela 14: Análise do dano de DNA pelo ensaio cometa em células Caco-2 expostas durante 24 h ao padrão de mitraginina (MG-P) e a extratos de 3 amostras comerciais de *Kratom*: *Kratom Bali Resin* (Kr10BR - Resina), *Kratom Bali Extract 15x* (Kr11BE15x – Extrato 15x em pó) e *Kratom Gold Extract* (Kr12BEg – Extrato em pó).

	<i>Tail Intensity (%)</i>	<i>Olive Tail Moment</i>
Controlo	6,24 ± 0,63	1,05 ± 0,17
Veículo (MeOH 0,5%)	6,16 ± 0,55	0,92 ± 0,11
Controlo Positivo (MMS 500 µM)	67,00 ± 4,89 ****	21,20 ± 5,27 ****
MG-P (µg/mL)		
2,5	6,68 ± 0,72	1,00 ± 0,16
5	5,64 ± 0,37	0,83 ± 0,07
Kr10BR (µg/mL)		
2,5	24,52 ± 6,16	4,28 ± 1,26
5	48,21 ± 3,81 ***	12,37 ± 1,45 ***
Kr11BE15x (µg/mL)		
2,5	47,90 ± 2,26 **	10,83 ± 1,03 **
5	47,69 ± 3,68 **	10,74 ± 1,35 **
Kr12BEg (µg/mL)		
2,5	13,21 ± 3,64	2,05 ± 0,63
5	38,10 ± 4,20 ***	7,92 ± 1,61 ***

Os dados são apresentados como Média ± SEM (n= 2 por grupo, em 3 experiências independentes). Os resultados foram analisados recorrendo ao teste *Kruskal-Wallis* seguido do teste de *Dunn*. ** P<0,01, *** P<0,001 vs controlo.

As estruturas resultantes do ensaio cometa, após o período de incubação de 24 h com o MG-P e com os extratos das amostras comerciais de *Kratom*, foram observadas por microscopia de fluorescência para estimar as quebras no DNA refletidas pela intensidade e tamanho da cauda dos cometas. Na **Figura 43** é possível observar imagens representativas de células Caco-2 controlo e células expostas às substâncias teste. As células não-expostas apresentam apenas uma cauda residual. Nas células expostas a qualquer dos compostos testados, nota-se um aumento da cauda dos cometas, aumento esse dependente da concentração. Os cometas das células expostas aos extratos das amostras comerciais testadas apresentam uma cauda mais pronunciada em relação aos do MG-P. Dentro dos extratos das amostras de *Kratom*,

nota-se uma cauda maior a partir da concentração 2,5 µg/mL nas amostras Kr11BE15x e Kr10BR em relação à amostra Kr12BEg.

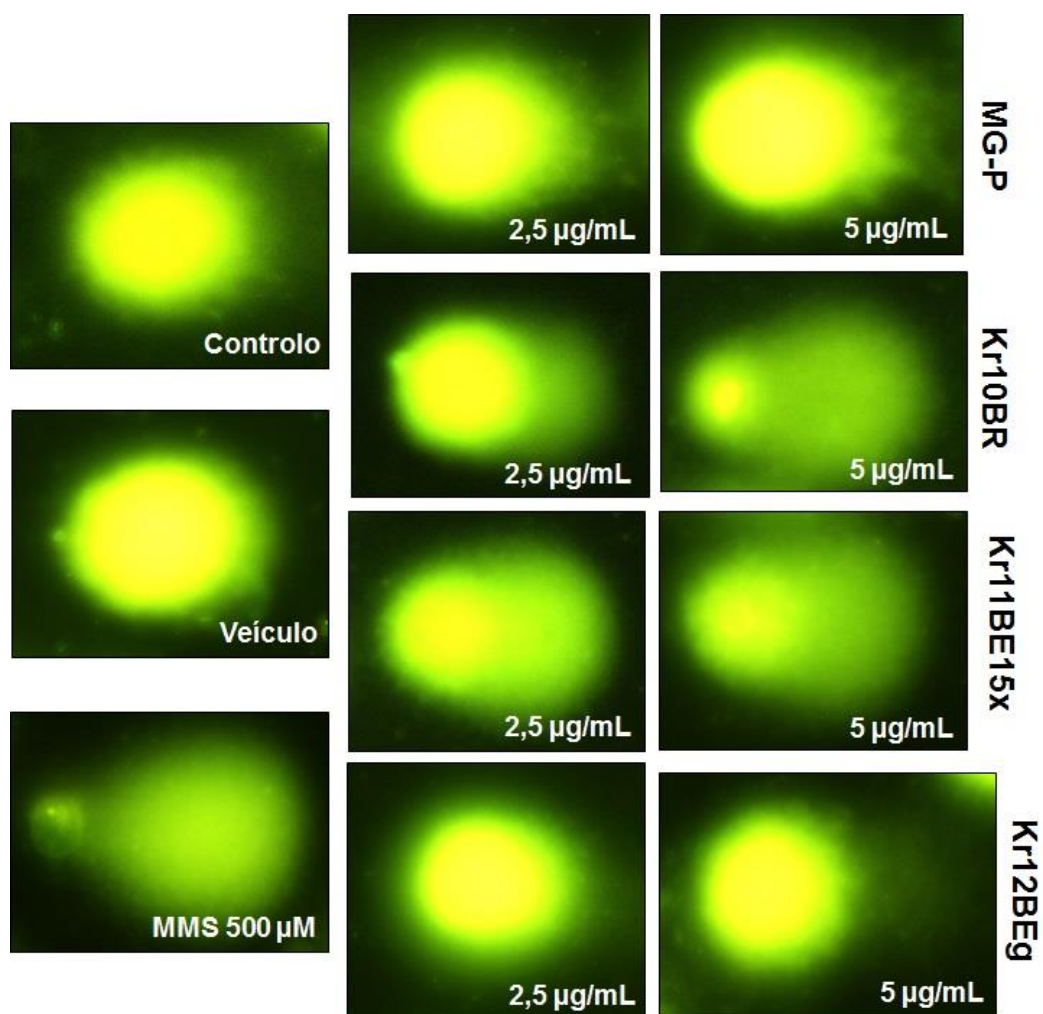


Figura 43: Imagens representativas do ensaio cometa nas células Caco-2, após 24 horas de exposição à mitraginina padrão (MG-P) e aos extratos Kr10BR, Kr11BE15x e Kr12BEg de amostras comerciais de *Kratom*: controlo; veículo (MeOH 0,5%); controlo positivo (MMS 500 µM); 2,5 µg/mL e 5 µg/mL (ampliação 200x).

Parte V

Discussão

Pela falta de segurança que as novas NPS apresentam para os consumidores pelo desconhecimento da sua composição e pela insuficiência de estudos toxicológicos sobre elas, é fundamental que a sua composição real, assim como a sua toxicidade, seja avaliada exaustivamente. Por ser uma das *smartdrugs* mais procuradas na Europa, este trabalho teve como objetivos caracterizar quimicamente por GC-MS extratos de amostras comerciais de *Kratom*, vendidas nas *smartshops* ou pela Internet, como também avaliar a sua citotoxicidade e genotoxicidade nos modelos *in vitro* de células intestinais e neuronais.

Na caracterização química das amostras comerciais de *Kratom* por GC-MS foi proposto um método para a análise das substâncias com maior atividade psicoativa: a MG, a 7-OHMG, a PAY, a ESPG, a ESPC e a CORY A/B. A mistura intermédia de CHCl_3 :MeOH (1:2) com ultrassonização mostrou ser o processo extrativo mais eficaz à separação dos alcalóides, como também à sua resolução cromatográfica. A preparação da amostra é uma das mais simples e rápidas dentro dos estudos existentes para amostras comerciais e plantas, como também utiliza apenas uma pequena porção de amostra (50 mg) [31, 54, 56-60, 70, 71, 129]. Além disso, com a extração e a análise de GC-MS, conseguiu-se identificar, quantificar a MG e semi-quantificar os seus análogos, enquanto a maior parte dos estudos existentes apenas identifica os compostos, centrando-se apenas na mitraginina [56, 58, 60, 71]. Quanto à validação do método, com um LOD de 1,51 $\mu\text{g/mL}$ e um LOQ de 5,03 $\mu\text{g/mL}$, conclui-se que não é o método mais sensível para a análise da mitraginina em amostras comerciais de *Kratom*, visto que o estudo de Chittrakan et al. (2012) apresenta limites de deteção e quantificação inferiores (1,00 e 3,00 $\mu\text{g/mL}$, respetivamente) [57]. No entanto, este estudo utiliza a técnica de HPLC-DAD, uma técnica que sugere uma maior complexidade na otimização do método, além do que a existência de um equipamento de GC-MS é mais usual em laboratórios, aumentando assim a preferência e a funcionalidade do nosso método proposto. Além disso, o estudo de Chittrakan et al. (2012) tem outras limitações: apenas quantifica a MG nas amostras e não as outras substâncias análogas potencialmente psicoativas, como também apenas analisa um cocktail de *Kratom* e não várias amostras diferentes. Quanto à precisão do método, quer na repetibilidade (0,12% – 3,31% ou na reprodutibilidade (1,74% - 17,88%), obtiveram-se %CV inferiores a 20%, sendo este valor perfeitamente admissível para este tipo de análise [132]. O método proposto é o único método analítico validado para a análise da MG e dos seus análogos, permitindo a sua identificação e quantificação, além de ser o único nestes termos utilizando a técnica de GC-MS.

Na análise dos extratos das amostras comerciais de *Kratom* detetou-se concentrações de MG superiores às dos outros analitos, observando-se discrepâncias

maiores entre este alcalóide nos extratos das diferentes amostras. No entanto, nas embalagens das amostras não existe qualquer referência à quantidade de MG ou outros alcalóides que constituem o produto, descrevendo apenas a “potência” do produto em algumas delas. O extrato de uma amostra comercial de *Kratom* com maior concentração de MG e análogos é a Kr12BEg (*Kratom Gold Extract*), do tipo extrato em pó, com concentrações 50 vezes superiores às das outras amostras, no entanto na sua embalagem não é referenciado qualquer tipo de informação sobre a sua potência, apesar do seu preço por grama ser o mais elevado. Na análise de todos os outros extratos, destaca-se o extrato da amostra Kr02BE15x (*Kratom Bali Extract 15x*), Kr08F (*Kratom Folhas*) e Kr10BR (*Kratom Bali Resin*). Todas as restantes amostras contêm uma concentração de MG e análogos semelhantes entre si, observando-se apenas pequenas diferenças, mesmo sendo amostras de diferentes tipos, com potências e preços de comercialização diferentes. Dentro dos extratos das amostras de extratos 15x em pó, a concentração de MG no extrato da amostra Kr02BE15x evidencia-se em relação às outras duas, contudo são todas elas referenciadas como amostras com a potência de 15x. Além da mesma potência, o extrato desta amostra e o extrato da amostra Kr11BE15x (*Kratom Bali Extract 15x*) são ambos provenientes de Bali, o que significaria possuírem a mesma quantidade de alcalóides pela mesma origem, no entanto isto não se verifica. Também o preço destas duas amostras é bastante discrepante, sendo que o extrato da amostra Kr02BE15x, com a maior concentração de alcalóides, tem um preço 4 vezes superior ao extrato da amostra Kr11BE15x. A dose a consumir descrita também não está de acordo com a sua composição, visto que o extrato da amostra com menor concentração de alcalóides das três (Kr04TE15x) indica a dose inferior para consumo. É de salientar, que todas estas diferenças na composição da droga não são notadas pelo consumidor, visto que as embalagens dos produtos são exatamente iguais. Comparando os extratos das amostras “extratos 15x” com o extrato da amostra “extrato 25x”, verifica-se que a concentração de MG e análogos neste último é ligeiramente menor ao extratos das amostras com indicação de potência menor, sendo esta concentração até inferior a uma das amostras 15x (Kr02BE15x), significando mais uma vez que as potências descritas nos rótulos dos produtos não correspondem proporcionalmente à quantidade de alcalóides existente nelas. Quanto à dose a consumir, os produtos referenciam uma dose semelhante para ambos os tipos de amostra. Relativamente ao custo dos produtos, o preço por grama com potência 15x é superior ao das amostras 25x, o que está de acordo com a quantidade de substâncias psicoativas presentes, contudo continua sem estar coerente em relação à potência indicada no rótulo. Quanto aos extratos das amostras de *Kratom* do tipo folhas secas partidas e em pó, as suas concentrações de MG e análogos são bastantes semelhantes,

destacando-se apenas o extrato da amostra Kr08F pela concentração bastante inferior, comparando com as outras amostras do mesmo tipo. Em relação à dose a consumir descrita são todas semelhantes entre si. A amostra Kr08F é uma amostra de origem desconhecida, vendida com o preço mais baixo de todas, onde a quantidade de MG e análogos é cerca de 5 vezes menor que as outras amostras de folhas. Neste produto não é descrita qual a dose adequada para o consumo ou determinado efeito. A seguir ao extrato da amostra de folhas secas partidas Kr08F, o extrato da amostra de resina de *Kratom* foi um dos que apresentou as concentrações mais baixas de alcalóides, sendo o seu produto dos mais baratos para o consumidor. Contudo, no seu rótulo, é referenciado que se necessita de uma dose bastante elevada para que haja um efeito psicoativo. Com estes resultados, conclui-se que a informação sobre as potências e a dose a consumir dos produtos não coincidem proporcionalmente com a quantidade de alcalóides que os constituem. Contudo, o custo das amostras com maior concentração de MG e análogos é superior. Além disso, a descrição dos efeitos “reduzidos” e “fortes” referenciados nas embalagens não são confiáveis visto que ainda não estão estabelecidas quais as quantidades de *Kratom* que provocam um efeito estimulante ou sedativo. Nestes produtos também não é referenciado se a origem ou o tipo de amostra influencia a sua composição em alcalóides. Um estudo deste género foi também efetuado por Moreira et al. (2014) para amostras comerciais de *Salvia divinorum*, tendo os autores verificado também uma discordância entre a potência indicada nos produtos e a quantidade de substâncias psicoativas existentes [141].

Na literatura, o estudo de Kikura-Hanajiri et al. (2009) é o único que identifica e quantifica a MG e a 7-OHMG em diferentes amostras comerciais de *Kratom*. Neste estudo foram analisadas 13 amostras diferentes, incluindo amostras do tipo folhas secas, resina e pó. As informações descritas nestes produtos são escassas, sendo apenas referenciado o seu nome, e em algumas delas o seu tipo. Como representado na **Tabela 15**, existem diferenças entre os intervalos de concentração de MG encontrados por Kikura-Hanajiri et al. (2009) e os deste estudo, mesmo em amostras do mesmo tipo. Além destas diferenças poderem estar relacionadas com o método analítico estabelecido para a análise das amostras, estas também podem estar relacionadas com o desconhecimento da potência dos produtos no estudo de Kikura-Hanajiri et al. (2009) visto que apenas uma das amostras referenciava este aspeto (*Mitragyna 40x resin*), tornando-se assim difícil encontrar uma forma de as comparar corretamente. Também a origem das amostras pode influenciar a quantidade de alcalóides presente, como também o seu próprio fornecedor. No entanto, equiparando a quantidade de MG e 7-OHMG da amostra *Kratom Gold Extract* (Kr12BEg) deste estudo (187,40 mg/g; 57,73

mg/g, respetivamente), com a amostra *Kratom Gold KR-G* do estudo de Kikura-Hanajiri et al. (2009) (18,9 mg/g, 0,267 mg/g, respetivamente) observa-se uma grande discrepância nas concentrações apesar da proximidade dos seus nomes. Deste modo, discute-se mais uma vez o perigo desta droga porque não existe uma semelhança na composição real entre várias amostras adquiridas em locais diferentes, embora sejam do mesmo tipo.

Tabela 15: Comparação entre as concentrações de MG e 7-OHMG nas amostras comerciais de *Kratom* num estudo da literatura e no presente estudo.

	Tipo de Amostra	Concentrações MG (mg/g)	Concentrações 7-OHMG (mg/g)
Kikura-Hanajiri et al. (2009) (n=13)	Folhas Secas	0,8 – 21,2	0,114 – 0,361
	Pó	18,9 – 21,4	0,159 – 0,393
	Resina	35,6 – 62,6	0,116 – 0,367
Presente estudo (n=13)	Folhas Secas	0,64 – 3,04	0,57 – 0,58
	Pó	2,66 – 187,4	0,58 – 57,73
	Resina	0,83	0,60

No estudo da citotoxicidade provocada pelos extratos das amostras comerciais de *Kratom* e pela MG-P, através dos ensaios da redução do MTT e da captação do vermelho neutro, os valores de IC₅₀ estimados, como também a alteração da viabilidade celular em relação às células não-expostas, permitiram avançar conclusões sobre os resultados obtidos. Em ambas as linhas celulares estudadas, observa-se um maior efeito citotóxico às 24 horas do que às 6 horas de exposição, efeito este dependente da concentração de MG no referido extrato. Verifica-se ainda que as células SH-SY5Y sofrem uma maior diminuição da sua viabilidade em relação às células Caco-2, sendo o modelo celular neuronal mais suscetível às amostras de *Kratom* testadas. Comparando os resultados obtidos do ensaio de redução do MTT com os do ensaio de captação do vermelho neutro nas células Caco-2, estima-se que o segundo seja o mais sensível para a avaliação da citotoxicidade do *Kratom* neste modelo *in vitro*. Pelo contrário, na linha celular SH-SY5Y estima-se que o ensaio de redução do MTT seja o mais sensível. Esta discrepância verificada em relação à sensibilidade dos ensaios pode estar relacionada com o número de experiências superior feito para os ensaios NR em relação aos ensaios MTT, para o qual apenas foi realizada uma experiência. No entanto, a confirmarem-se, estes resultados sugerem que os mecanismos envolvidos na toxicidade induzida por estes compostos poderão ser diferentes nos dois modelos celulares, uma vez que estes

dois ensaios avaliam parâmetros diferentes, a integridade da membrana lisossomal e a atividade metabólica.

Na avaliação da citotoxicidade dos extratos das amostras comerciais de *Kratom*, apesar de serem testadas as mesmas concentrações de MG em todos, a amostra Kr10BR (*Kratom Bali Resin*) revelou ser a amostra com maior toxicidade nas linhas celulares Caco-2 e SH-SY5Y, às 24 h de exposição. Contudo, este extrato de resina de *Kratom* tem uma concentração de análogos da MG inferior às outras amostras, o que sugere que os efeitos citotóxicos não são provocados por estas substâncias psicoativas analisadas na caracterização química mas por outras substâncias potencialmente prejudiciais à saúde e ainda desconhecidas. Além disso, existe a possibilidade da toxicidade observada estar relacionada com um efeito aditivo ou sinérgico provocado pela mistura de alcalóides nesta droga. Para além do extrato da amostra Kr10BR, os extratos das amostras Kr12BEg (*Kratom Gold Extract*) e Kr11BE15x (*Kratom Bali Extract 15x*) foram os que provocaram um efeito citotóxico mais marcado nos dois modelos *in vitro*, sendo que todos eles são do tipo “extratos em pó” de *Kratom*, embora com potências diferentes. Desta forma, conclui-se que os extratos das amostras na forma de “extratos em pó” e resina, das mais consumidas pelos consumidores, apresentam uma toxicidade bastante superior aos extratos das amostras de folhas secas partidas ou em pó, apesar destas também diminuírem significativamente a viabilidade celular. Os extratos das amostras de “extratos em pó” são os possuem as maiores concentrações de análogos da MG. No entanto, como também verificado na caracterização química, as potências descritas nestes produtos não correspondem proporcionalmente ao seu efeito visto que o extrato da amostra Kr13BEr25x é dos extratos com um efeito citotóxico menor, apesar de ser descrita com uma potência de 25x. É de salientar ainda, que o extrato da amostra Kr12BEg possui uma quantidade de análogos da MG bastante superior a todas as outras, no entanto mostrou uma resposta citotóxica inferior à Kr10BR – um dos extratos com menor concentração de substâncias psicoativas. Comparando a citotoxicidade dos extratos das amostras comerciais de *Kratom* com a MG-P, em ambas as linhas celulares, a MG-P mostrou ser menos tóxica que os extratos em pó referenciados anteriormente, o que indica que os efeitos citotóxicos destes extratos não se devem apenas ao seu constituinte maioritário, a MG, mas também a outras substâncias, psicoativas ou não, que constituem as drogas. Novamente, a hipótese de interação entre os constituintes dos extratos na mistura pode também potenciar a citotoxicidade observada. Em relação às restantes amostras testadas, os resultados são um pouco discordantes entre os ensaios de redução do MTT e de captação vermelho

neutro dentro do mesmo modelo *in vitro*, podendo este resultado controverso ser explicado por ter sido feito apenas uma experiência para o ensaio de redução do MTT.

Na literatura, não existe nenhum estudo que contemple o estudo da citotoxicidade provocada pelas amostras de *Kratom* vendidas nas *smartshops* ou através da Internet, sendo este trabalho pioneiro neste sentido. Contudo, existem três estudos *in vitro* que avaliam a toxicidade da planta *Mitragyna speciosa* e da MG [128-130]. Os estudos de Saidin et al. (2007, 2008) mostraram que os extratos de *Mitragyna speciosa* provocaram citotoxicidade nas linhas celulares humanas linfoblásticas, renais e neuronais em ensaios de proliferação celular e de clonogenicidade. Estes autores verificaram que a citotoxicidade dependia da concentração, observando uma diminuição significativa da viabilidade celular na concentração de 1000 µg/mL. No presente estudo, a diminuição significativa da viabilidade celular nas linhas celulares neuronais e intestinais ocorreu em gamas de concentração muito inferiores a 1000 µg/mL visto que a gama de concentrações testadas foi apenas de 0-60 µg/mL de MG [128, 129]. Desta forma, observa-se que as amostras comerciais de *Kratom* apresentam uma citotoxicidade bastante superior à planta *Mitragyna speciosa*, sendo estas amostras as mais consumidas e, por isso, as mais perigosas para a saúde dos consumidores. O estudo de Moklas et al. (2008) também avaliou a citotoxicidade de extratos da *Mitragyna speciosa* e da MG com o teste de letalidade em artêmias salinas. Às 24 horas de exposição, estes autores concluíram que a MG foi a substância mais tóxica (LC₅₀ – 44 µg/mL), seguindo-se dos extratos aquosos (LC₅₀ – 62 µg/mL) e finalmente dos extratos purificados de alcalóides da planta (LC₅₀ – 98 µg/mL) [130]. Pelo contrário, no presente estudo, conclui-se que os extratos das amostras comerciais de *Kratom*, do tipo “extratos em pó”, são bastantes mais citotóxicos que a MG-P. Desta forma, corrobora-se a hipótese das amostras de *Kratom* comercializadas possuírem uma composição real bastante diferente da planta *Mitragyna speciosa*, havendo uma grande mistura de compostos desconhecidos nestas amostras. Ainda comparando o valor de LC₅₀ da MG no estudo de Moklas et al. (2008) com os valores de IC₅₀ obtidos neste trabalho, nota-se que nos ensaio de captação do vermelho neutro para ambas as linhas celulares obteve-se resultados com grande proximidade. No ensaio de redução do MTT, os valores de IC₅₀ são um pouco discordantes, podendo justificar-se com o número reduzido de experiências para este ensaio. (**Tabela 16**)

Tabela 16: Valores de IC₅₀, calculados no presente estudo, durante 24 horas de exposição das células Caco-2 e SH-SY5Y à MG-P.

IC ₅₀ MG (µg/mL)	Caco-2		SH-SY5Y	
	MTT	NR	MTT	NR
	29,14	42,51	37,10	42,64

Para o estudo do dano no DNA induzido pelos extratos das amostras comerciais de *Kratom* e pela MG-P, durante 24 h de exposição, foi efetuado o ensaio cometa em células de epitélio intestinal humano Caco-2. Este foi o modelo celular escolhido para este estudo, uma vez que as amostras que apresentaram mais citotoxicidade são consumidas por via oral. O critério de selecção das amostras a testar teve por base o maior efeito citotóxico induzido pelos seus extratos nesta linha celular e o seu maior consumo. As concentrações testadas foram relativas à MG presente em cada um dos extratos das amostras. Nas condições experimentais testadas, a MG-P não induziu dano no DNA o que se refletiu pela ausência de qualquer alteração significativa dos parâmetros avaliados em relação às células não-expostas. Pelo contrário, o extrato da amostra Kr11BE15x mostrou aumentar significativamente o dano no DNA, em ambas as concentrações, e nos dois parâmetros avaliados. Os extratos das amostras Kr10BR e Kr12BEg mostraram-se significativamente genotóxicos na concentração mais elevada testada (5 µg/mL). Tal como foi observado nos ensaios de citotoxicidade, o extrato da resina de *Kratom* revelou ser a mais tóxica ao nível mitocondrial, lisossomal e do DNA, apesar de ser uma das amostras com menor quantidade dos alcalóides análogos à MG. Pelo contrário, o extrato da amostra Kr12BEg com uma concentração de análogos bastante superior às outras, mostra ter uma genotoxicidade muito próxima do extrato Kr10BR. Esta situação comprova, mais uma vez, que os compostos desconhecidos do extrato da amostra Kr10BR, que não foram identificados na caracterização química, são possivelmente os responsáveis por esta genotoxicidade e/ou a interação entre os compostos na mistura do extrato.

Mais uma vez, na literatura, não existe nenhum estudo onde seja avaliada a genotoxicidade das amostras comerciais de *Kratom*. Contudo, um estudo de Saidin et al. (2008) avalia o dano no DNA provocado pelos extratos de *Mitragyna speciosa* usando o *Mouse Lymphoma tk Gene Mutation Assay* num modelo *in vitro* neuronal. Estes autores não observaram qualquer genotoxicidade provocada por estas substâncias testadas [129]. Outro estudo mais recente de Ghazali et al. (2011) investiga a mutagenicidade provocada pelos extratos aquosos de *Mitragyna speciosa*, através do teste de Ames, no entanto os autores não observaram qualquer atividade mutagénica [131]. Os resultados

do presente estudo está na direção oposta aos resultados de Saidin et al. (2008) e Ghazali et al. (2011), contudo os diferentes ensaios utilizados para a avaliação da genotoxicidade, assim como os diferentes modelos celulares usados, podem influenciar as conclusões a retirar. Além disso, os autores avaliaram o dano no DNA e a mutagenicidade provocados por extratos da planta, e não pelas amostras de *Kratom* que são vendidas nas *smartshops* ou pela Internet para consumo humano, o que significa que a estas amostras comercializadas são adicionadas outras substâncias potencialmente perigosas e desconhecidas para os consumidores.

Parte VI

Conclusão

Um método analítico reprodutível, preciso e sensível, usando a análise por GC-MS, foi desenvolvido para identificar e quantificar a MG e seus análogos em 13 amostras de *Kratom* adquiridas nas *smartshops* e através da Internet. O método proposto permitiu a separação de 6 alcalóides (MG, 7-OHMG, PAY, CORY A/B, ESPC, ESPG) com uma boa resolução cromatográfica. Para a MG, o método mostrou ser linear na gama de concentrações 0 – 100 µg/mL e 0 - 750 µg/mL, com um R^2 de 0,9980 e 0,9978, respetivamente, e sensível com um LOD de 1,51 µg/mL e um LOQ de 5,03 µg/mL. A precisão *intra-day* foi verificada com a % CV entre 0,12% - 3,31%, como também a precisão *inter-day* com um intervalo entre 1,74% - 17,88%, sendo estes valores considerados aceitáveis para a análise em questão. Este método apresenta melhorias em relação a outros métodos analíticos descritos na literatura, visto que a preparação da amostra é simples e rápida, não necessitando de derivatização, para além de utilizar apenas uma pequena porção de amostra. Além disso, é o único método proposto, com análise por GC-MS, que identifica e quantifica simultaneamente os vários alcalóides presentes em amostras comerciais de *Kratom*.

Os extratos das amostras comerciais de *Kratom* analisadas diferem entre si principalmente na quantidade de MG. Contudo, as concentrações de MG e análogos encontradas não coincidem com a potência, nem com a dose a consumir indicada na embalagem dos produtos, apesar dos extratos com maior quantidade de alcalóides serem vendidas a um custo superior. Desta forma, além do consumidor ter falta de informação sobre a composição real da droga, assim como a sua origem, tem também informações erradas do que está a consumir. É de destacar que mesmo as amostras com o mesmo nome, e com as embalagens exatamente iguais, contêm diferentes quantidades de substâncias psicoativas. Além disso, as doses a consumir referidas nos produtos são totalmente irreais visto que, até à data, ainda não é conhecida a quantidade de *Kratom* que provoca um efeito estimulante ou sedativo.

Para relacionar a composição de alcalóides encontrada nos extratos destas amostras com os seus efeitos, e com a MG-P, um estudo de citotoxicidade às 6 e 24 h de exposição, nas linhas celulares Caco-2 e SH-SY5Y, foi efetuado através da avaliação da viabilidade celular. Em ambos os modelos celulares o efeito citotóxico observado é dependente da concentração. A linha celular neuronal mostrou ser mais sensível aos extratos das amostras de *Kratom* testados. Os extratos das amostras de resina de *Kratom* e da maioria dos “extratos em pó” revelaram-se os mais citotóxicos, sendo também estas as amostras mais consumidas, sendo o MG-P menos citotóxico que estes extratos. Contudo, o MG-P mostrou uma toxicidade superior a alguns extratos de folhas analisados. O facto do extrato de resina ser o mais citotóxico, com uma das menores

quantidades de alcalóides encontrada, como também a MG-P ter uma toxicidade inferior a estes extratos, indica que existem outras substâncias, análogas ou não da MG, desconhecidas no *Kratom* que estão a provocar esta citotoxicidade e/ou que existe uma interação entre os compostos que provoquem um efeito aditivo ou sinérgico.

Com a escassez de estudos sobre os efeitos de amostras comerciais de *Kratom*, foi avaliada a genotoxicidade, às 24 horas de exposição, no modelo celular do epitélio intestinal. Foram testados os extratos em pó mais consumidos e que apresentaram os maiores efeitos citotóxicos, e o MG-P. Mais uma vez, todos os extratos de amostras de resina e de “extratos em pó” provocaram um dano significativo no DNA, exceto o MG-P, destacando-se ligeiramente o extrato da amostra de resina e um extrato em pó “Gold”. Desta forma, conclui-se novamente que são outras substâncias desconhecidas no *Kratom*, ou os análogos da MG, que estão a provocar todos estes malefícios e/ou a mistura dos alcalóides estar a potenciar os seus efeitos.

Parte VII

Referências

1. Kapka-Skrzypczak, L., et al., *Legal highs-legal aspects and legislative solutions*. Annals of agricultural and environmental medicine: AAEM, 2011. **18**(2): p. 304.
2. Vardakou, I., C. Pistos, and C. Spiliopoulou, *Drugs for youth via Internet and the example of mephedrone*. Toxicology letters, 2011. **201**(3): p. 191-195.
3. Wciórka, B., *Opinie i diagnozy nr 8 Społeczeństwo obywatelskie 1998-2008*. Warszawa: CBOS, 2010.
4. Zuba, D., B. Byrska, and M. Maciow, *Comparison of "herbal highs" composition*. Analytical and bioanalytical chemistry, 2011. **400**(1): p. 119-126.
5. Observatório Europeu das Drogas e Toxicodependência, *O desafio para a política de luta contra a droga na Europa dos nossos dias*, in *Relatório Anual do Observatório Europeu das Drogas e Toxicodependência*. 2012. p. 13-19.
6. Observatório Europeu das Drogas e da Toxicodependência, *Síntese: Problemas de droga antigos e novos - o panorama europeu em 2013* in *Relatório Europeu Sobre Drogas: Tendências e evoluções*. 2013. p. 10 - 14.
7. Davis, G.G., *Drug abuse: newly-emerging drugs and trends*. Clinics in laboratory medicine, 2012. **32**(3): p. 407.
8. McElrath, K. and C. O'Neill, *Experiences with mephedrone pre-and post-legislative controls: perceptions of safety and sources of supply*. International Journal of Drug Policy, 2011. **22**(2): p. 120-127.
9. Gong, F., et al., *Genus Mitragyna: Ethnomedicinal uses and pharmacological studies*. Phytopharmacology, 2012. **3**(2): p. 263-272.
10. Shellard, E., *Ethnopharmacology of kratom and the Mitragyna alkaloids*. Journal of ethnopharmacology, 1989. **25**(1): p. 123.
11. Babu, K.M., C.R. McCurdy, and E.W. Boyer, *Opioid receptors and legal highs: Salvia divinorum and Kratom*. Clinical toxicology, 2008. **46**(2): p. 146-152.
12. Carey, S.O.M., *Psychoactive Substances Manual: A guide to ethnobotanical plants and herbs, synthetic chemicals, compounds and products*. 2010: Clonmel: Drug Education Officer.

13. European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction. *Kratom (Mitragyna speciosa)*. [cited 2014; Available from: <http://www.emcdda.europa.eu/publications/drug-profiles/kratom>.
14. Kronstrand, R., et al., *Unintentional fatal intoxications with mitragynine and O-desmethyiltramadol from the herbal blend Krypton*. Journal of analytical toxicology, 2011. **35**(4): p. 242-247.
15. Observatório Europeu das Drogas e da Toxicodependência, *Novas drogas e tendências emergentes*, in *Relatório Anual do Observatório Europeu das Drogas e da Toxicodependência*. 2012. p. 100-105.
16. Boyer, E.W., et al., *Self-Treatment of Opioid Withdrawal with a Dietary Supplement, Kratom*. The American Journal on Addictions, 2007. **16**(5): p. 352-356.
17. Adkins, J., E. Boyer, and C. McCurdy, *Mitragyna speciosa, a psychoactive tree from Southeast Asia with opioid activity*. Current topics in medicinal chemistry, 2011. **11**(9): p. 1165.
18. Beckett, A., et al., *Alkaloids from Mitragyna speciosa (Korth.)*. Journal of Pharmacy and Pharmacology, 1965. **17**(11): p. 753-755.
19. Takayama, H., *Chemistry and pharmacology of analgesic indole alkaloids from the rubiaceous plant, Mitragyna speciosa*. Chemical and pharmaceutical bulletin, 2004. **52**(8): p. 916-928.
20. Hassan, Z., et al., *From Kratom to mitragynine and its derivatives: Physiological and behavioural effects related to use, abuse, and addiction*. Neuroscience and biobehavioral reviews, 2013. **37**(2): p. 138-151.
21. Macko, E., J. Weisbach, and B. Douglas, *Some observations on the pharmacology of mitragynine*. Archives internationales de pharmacodynamie et de thérapie, 1972. **198**(1): p. 145-161.
22. Maruyama, T., et al., *The botanical origin of kratom (Mitragyna speciosa; Rubiaceae) available as abused drugs in the Japanese markets*. Journal of natural medicines, 2009. **63**(3): p. 340-344.
23. United Nations Office on Drugs and Crime, *2.New Psychoactive Substances*, in *World Drug Report 2013*. 2013. p. 94 - 95.

24. United Nations Office on Drugs and Crime, *Patterns and Trends of Amphetamine-Type Stimulants and Other Drugs: Asia and Pacific - 2012*, in *Global SMART Programme 2012*. 2012.
25. Office of the Narcotics Control Board, *Thailand Narcotics Control: Annual Report 2010*. 2010.
26. United Nations Office on Drugs and Crime, *The Challenge of New Psychoactive Substances*, in *Global SMART Programme 2013*. 2013.
27. Diário da República nº75 de 17 de Abril - I Série, *Decreto-Lei nº54/2013. 1. Regime Jurídico da prevenção e proteção contra a publicidade e o comércio das novas substâncias psicoativas*. 2013.
28. Diário da República nº207 de 25 de Outubro - I Série, *Decreto Legislativo Regional nº28/2012/M, de 25 de Outubro. Regime Jurídico aplicável ao tráfico de substâncias psicoativas não especificamente controladas ao abrigo de legislação própria*. 2012.
29. Horie, S., et al., *Indole alkaloids of a Thai medicinal herb, Mitragyna speciosa, that has opioid agonistic effect in guinea-pig ileum*. *Planta medica*, 2005. **71**(03): p. 231-236.
30. Matsumoto, K., et al., *Antinociception, tolerance and withdrawal symptoms induced by 7-hydroxymitragynine, an alkaloid from the Thai medicinal herb Mitragyna speciosa*. *Life sciences (New York, NY: 1973)*, 2005. **78**(1): p. 2-7.
31. Wang, M., et al., *Comparison of three chromatographic techniques for the detection of mitragynine and other indole and oxindole alkaloids in Mitragyna speciosa (kratom) plants*. *Journal of separation science*, 2014.
32. Beckett, A.H., et al., *The Mitragyna Species of Asia - Part. VI. Oxindole alkaloids from the leaves of Mitragyna speciosa Korth.1, 2*. *Planta Med*, 1966. **14**(03): p. 266-276.
33. Kerschgens, I., *Total Synthesis of (-)-Mitragynine and Analogues*. 2012.
34. Takayama, H., et al., *Structure revision of mitragynaline, an indole alkaloid in Mitragyna speciosa*. *Tetrahedron Letters*, 2001. **42**(9): p. 1741-1743.

35. Field, E., *XCVIII.—Mitragynine and mitraversine, two new alkaloids from species of mitragyne*. Journal of the Chemical Society, Transactions, 1921. **119**: p. 887-891.
36. Hooper, D., *The anti-opium leaf*. Pharm. Journ, 1907. **78**: p. 453.
37. Ing, H.R. and C.G. Raison, 210. *The alkaloids of Mitragyne speciosa. Part I. Mitragynine*. Journal of the Chemical Society (Resumed), 1939: p. 986-990.
38. Zacharias, D.E., R.D. Rosenstein, and G.A. Jeffrey, *The structure of mitragynine hydroiodide*. Acta Crystallographica, 1965. **18**(6): p. 1039-1043.
39. Takayama, H., et al., *The First Total Synthesis of (-)-Mitragynine, An Analgesic Indole Alkaloid in Mitragyna speciosa*. Tetrahedron Letters, 1995. **36**(51): p. 9337-9340.
40. Kerschgens, I.P., et al., *Total syntheses of mitragynine, paynantheine and speciogynine via an enantioselective thiourea-catalysed Pictet–Spengler reaction*. Chemical Communications, 2012. **48**(100): p. 12243-12245.
41. Saxton, J.E., *The Chemistry of Heterocyclic Compounds, Indoles: The Monoterpenoid Indole Alkaloids*. Vol. 88. 2009: Wiley-Interscience.
42. Matsumoto, K., *Pharmacological Studies on 7-Hydroxymitragynine, Isolated from the Thai Herbal Medicine Mitragyna speciosa: Discovery of an Orally Active Opioid Analgesic*. Department of Molecular Pharmacology and Pharmacotherapeutics, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Chiba University, Tokyo, 2006.
43. Matsumoto, K., et al., *Antinociceptive effect of 7-hydroxymitragynine in mice: Discovery of an orally active opioid analgesic from the Thai medicinal herb Mitragyna speciosa*. Life sciences, 2004. **74**(17): p. 2143-2156.
44. Ponglux, D., et al., *A new indole alkaloid, 7 α -hydroxy-7H-mitragynine, from Mitragyna speciosa in Thailand*. Planta medica, 1994. **60**.
45. Ruchirawat, S., *Alkaloids From The Plants Of Thailand*, in *The Alkaloids: Chemistry and Pharmacology V41: Chemistry and Pharmacology*. 1992.
46. Heitzman, M.E., et al., *Ethnobotany, phytochemistry and pharmacology of Uncaria (Rubiaceae)*. Phytochemistry, 2005. **66**(1): p. 5-29.

47. Sakakibara, I., et al., *Effect on locomotion of indole alkaloids from the hooks of Uncaria plants*. Phytomedicine, 1999. **6**(3): p. 163-168.
48. Chen, L.L., et al., *Corynoxine, a Natural Autophagy Enhancer, Promotes the Clearance of Alpha-Synuclein via Akt/mTOR Pathway*. Journal of Neuroimmune Pharmacology, 2014. **9**(3): p. 380-387.
49. Durairajan, S.S.K., et al., *Corynoxine isomers decrease levels of amyloid- β peptide and amyloid- β precursor protein by promoting autophagy and lysosome biogenesis*. 2013.
50. Philipp, A.A., et al., *Phase I and II metabolites of speciogynine, a diastereomer of the main Kratom alkaloid mitragynine, identified in rat and human urine by liquid chromatography coupled to low-and high-resolution linear ion trap mass spectrometry*. Journal of mass spectrometry, 2010. **45**(11): p. 1344-1357.
51. Philipp, A.A., et al., *Metabolism studies of the Kratom alkaloids mitraciliatine and isopaynantheine, diastereomers of the main alkaloids mitragynine and paynantheine, in rat and human urine using liquid chromatography–linear ion trap-mass spectrometry*. Journal of Chromatography B, 2011. **879**(15): p. 1049-1055.
52. Philipp, A.A., et al., *Use of liquid chromatography coupled to low-and high-resolution linear ion trap mass spectrometry for studying the metabolism of paynantheine, an alkaloid of the herbal drug Kratom in rat and human urine*. Analytical and bioanalytical chemistry, 2010. **396**(7): p. 2379-2391.
53. Philipp, A.A., et al., *Studies on the metabolism of mitragynine, the main alkaloid of the herbal drug Kratom, in rat and human urine using liquid chromatography-linear ion trap mass spectrometry*. Journal of mass spectrometry, 2009. **44**(8): p. 1249-1261.
54. Kapp, F.G., et al., *Intrahepatic cholestasis following abuse of powdered Kratom (Mitragyna speciosa)*. Journal of Medical Toxicology, 2011. **7**(3): p. 227-231.
55. Holler, J.M., et al., *A drug toxicity death involving propylhexedrine and mitragynine*. Journal of analytical toxicology, 2011. **35**(1): p. 54-59.
56. Chan, K., C. Pakiam, and R.A. Rahim, *Psychoactive plant abuse: the identification of mitragynine in ketum and in ketum preparations*. Bulletin on narcotics, 2007: p. 249.

57. Chittrakarn, S., P. Penjamras, and N. Keawpradub, *Quantitative analysis of mitragynine, codeine, caffeine, chlorpheniramine and phenylephrine in a kratom (Mitragyna speciosa Korth.) cocktail using high-performance liquid chromatography*. Forensic science international, 2012. **217**(1): p. 81-86.
58. Cornara, L., et al., *Smart drugs: green shuttle or real drug?* International journal of legal medicine, 2013. **127**(6): p. 1109-1123.
59. Kikura-Hanajiri, R., et al., *Simultaneous analysis of mitragynine, 7-hydroxymitragynine, and other alkaloids in the psychotropic plant "kratom"(Mitragyna speciosa) by LC-ESI-MS*. Forensic toxicology, 2009. **27**(2): p. 67-74.
60. Kowalczyk, A.P., A. Łozak, and J.K. Zjawiony, *Comprehensive methodology for identification of Kratom in police laboratories*. Forensic science international, 2013. **233**(1): p. 238-243.
61. Kaewklum, D., et al., *Detection of Mitragynine and its metabolite in urine following ingestion of leaves of Mitragyna speciosa Korth*, in Schanzer, W., Geyer, H., Gotzmann, A., Mareck, U., *Recent Advances in Doping Analysis*. Sport and Buch StrauB, Koln. 2005. p. 403-406.
62. Le, D., M.M. Goggin, and G.C. Janis, *Analysis of Mitragynine and Metabolites in Human Urine for Detecting the Use of the Psychoactive Plant Kratom*. Journal of analytical toxicology, 2012. **36**(9): p. 616-625.
63. Lu, S., et al., *Quantitative analysis of mitragynine in human urine by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry*. Journal of Chromatography B, 2009. **877**(24): p. 2499-2505.
64. Philipp, A.A., et al., *Monitoring of kratom or Krypton intake in urine using GC-MS in clinical and forensic toxicology*. Analytical and bioanalytical chemistry, 2011. **400**(1): p. 127-135.
65. Janchawee, B., et al., *A high-performance liquid chromatographic method for determination of mitragynine in serum and its application to a pharmacokinetic study in rats*. Biomedical Chromatography, 2007. **21**(2): p. 176-183.
66. Moraes, N.V., et al., *Determination of mitragynine in rat plasma by LC-MS/MS: Application to pharmacokinetics*. Journal of Chromatography B, 2009. **877**(24): p. 2593-2597.

67. Parthasarathy, S., et al., *Determination of mitragynine in plasma with solid-phase extraction and rapid HPLC–UV analysis, and its application to a pharmacokinetic study in rat*. Analytical and bioanalytical chemistry, 2010. **397**(5): p. 2023-2030.
68. Vuppala, P.K., et al., *Development and validation of a UPLC-MS/MS method for the determination of 7-hydroxymitragynine, a μ -opioid agonist, in rat plasma and its application to a pharmacokinetic study*. Biomedical Chromatography, 2013. **27**(12): p. 1726-1732.
69. Orio, L., et al., *UAE, MAE, SFE-CO₂ and classical methods for the extraction of Mitragyna speciosa leaves*. Ultrasonics Sonochemistry, 2012. **19**(3): p. 591-595.
70. Charoonratanaa, T., et al., *Limitation of mitragynine biosynthesis in Mitragyna speciosa (Roxb.) Korth. through tryptamine availability*. Zeitschrift fur Naturforschung. C, Journal of biosciences, 2013. **68**(9-10): p. 394-405.
71. Sanagi, M.M., et al., *Determination of mitragynine for the identification of mitragyna species in Kedah (Malaysia) by gas chromatography-mass spectrometry*. Der Pharma Chemica, 2013. **5** (5): p. 131-138.
72. Beckett, A. and D. Morton, *The metabolism of corynantheidine and 9-methoxycorynantheidine-type alkaloids by liver microsomes*. Biochemical Pharmacology, 1967. **16**(8): p. 1609-1615.
73. Maurer, H.H., *Chemistry, pharmacology, and metabolism of emerging drugs of abuse*. Therapeutic drug monitoring, 2010. **32**(5): p. 544-549.
74. Philipp, A.A., et al., *Studies on the metabolism of mitragynine, the main alkaloid of the herbal drug Kratom, in rat and human urine using liquid chromatography-linear ion trap mass spectrometry*. Journal of mass spectrometry, 2009. **44**(8): p. 1249-1261.
75. Hanapi, N., et al., *Evaluation of Selected Malaysian Medicinal Plants on Phase I Drug Metabolizing Enzymes, CYP 2 C 9, CYP 2 D 6 and CYP 3 A 4 Activities in vitro*. International Journal of Pharmacology, 2010. **6**(4): p. 494-499.
76. Lim, E.L., et al., *In vitro evaluation of cytochrome P450 induction and the inhibition potential of mitragynine, a stimulant alkaloid*. Toxicology in Vitro, 2013. **27**(2): p. 812-824.

77. Jansen, K.L. and C.J. Prast, *Psychoactive properties of mitragynine (kratom)*. Journal of psychoactive drugs, 1988. **20**(4): p. 455-457.
78. Suwanlert, S., *A study of kratom eaters in Thailand*. Bulletin on narcotics, 1975. **27**(3): p. 21-27.
79. Grewal, K.S., *Observations on the pharmacology of mitragynine*. Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 1932. **46**(3): p. 251-271.
80. Davis, M.P. and G.W. Pasternak, *Opioid receptors and opioid pharmacodynamics*. Opioids in cancer pain, 2009: p. 1-27.
81. Gutsein, H. and H. Akil, *Opioid Analgesics*, in *Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics*, L.L. Hardman JG, Editor. 2011, McGraw-Hill: New York. p. 569-619.
82. DuPen, A., D. Shen, and M. Ersek, *Mechanisms of opioid-induced tolerance and hyperalgesia*. Pain Management Nursing, 2007. **8**(3): p. 113-121.
83. Wecker, L., et al., *Brody's Human Pharmacology Molecular To Clinical*. 2009: Elsevier Health Sciences.
84. Botpiboon, O., et al., *Effects of caffeine and codein on antinociceptive activity of alkaloid extract from leaves of kratom (Mitragyna speciosa Korth)*, in *The 35th Congress on Science and Technology of Thailand*. 2007: The Tide Resort (Bangsaen Beach), Chonburi, Thailand. October 15-17, 2009.
85. Reanmongkol, W., N. Keawpradub, and K. Sawangjaroen, *Effects of the extracts from Mitragyna speciosa Korth. leaves on analgesic and behavioral activities in experimental animals*. Songklanakarin J. Sci. Technol, 2007. **29**(Suppl 1): p. 39-48.
86. Sabetghadam, A., S. Ramanathan, and S. Mansor, *The evaluation of antinociceptive activity of alkaloid, methanolic, and aqueous extracts of Malaysian Mitragyna speciosa Korth leaves in rats*. Pharmacognosy Research, 2010. **2**(3): p. 181-185.
87. Shaik Mossadeq, W.M., et al., *Anti-inflammatory and antinociceptive effects of Mitragyna speciosa Korth methanolic extract*. Medical Principles and Practice, 2009. **18**(5): p. 378-384.

88. Takayama, H., et al., *Studies on the synthesis and opioid agonistic activities of mitragynine-related indole alkaloids: discovery of opioid agonists structurally different from other opioid ligands*. Journal of medicinal chemistry, 2002. **45**(9): p. 1949-1956.
89. Taufik Hidayat, M., et al., *Determination of mitragynine bound opioid receptors*. Advances in Medical and Dental Sciences, 2010. **3**(3): p. 65-70.
90. Thongpradichote, S., et al., *Identification of opioid receptor subtypes in antinociceptive actions of supraspinally-administered mitragynine in mice*. Life sciences, 1998. **62**(16): p. 1371-1378.
91. Yamamoto, L.T., et al., *Opioid receptor agonistic characteristics of mitragynine pseudoindoxyl in comparison with mitragynine derived from Thai medicinal plant Mitragyna speciosa*. General Pharmacology, 1999. **33**: p. 73-81.
92. Herkenham, M., et al., *Cannabinoid receptor localization in brain*. Proceedings of the national Academy of sciences, 1990. **87**(5): p. 1932-1936.
93. Krogsgaard-Larsen, P., K. Strømgaard, and U. Madsen, *Textbook of drug design and discovery*. 2010: CRC Press LLC.
94. Matsuda, L.A., et al., *Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA*. Nature, 1990. **346**(6284): p. 561-564.
95. Shamima, A.R., et al., *Antinociceptive action of isolated mitragynine from Mitragyna speciosa through activation of opioid receptor system*. International journal of molecular sciences, 2012. **13**(9): p. 11427-11442.
96. Iddid, S., et al., *Evaluation of analgesia induced by mitragynine, morphine and paracetamol on mice*. ASEAN Review of Biodiversity and Environmental Conservation (ARBEC). Article IV, 1998: p. 1-7.
97. Matsumoto, K., et al., *Orally Active Opioid μ/δ Dual Agonist MGM-16, a Derivative of the Indole Alkaloid Mitragynine, Exhibits Potent Antiallodynic Effect on Neuropathic Pain in Mice*. Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 2014. **348**(3): p. 383-392.
98. Matsumoto, K., et al., *Antinociceptive action of mitragynine in mice: evidence for the involvement of supraspinal opioid receptors*. Life sciences, 1996. **59**(14): p. 1149-1155.

99. Matsumoto, K., et al., *Inhibitory effect of mitragynine, an analgesic alkaloid from Thai herbal medicine, on neurogenic contraction of the vas deferens*. Life sciences, 2005. **78**(2): p. 187-194.
100. Watanabe, K., et al., *Inhibitory effect of mitragynine, an alkaloid with analgesic effect from Thai medicinal plant Mitragyna speciosa, on electrically stimulated contraction of isolated guinea-pig ileum through the opioid receptor*. Life sciences, 1997. **60**(12): p. 933-942.
101. Fakurazi, S., et al., *The combination of mitragynine and morphine prevents the development of morphine tolerance in mice*. Molecules, 2013. **18**(1): p. 666-681.
102. Matsumoto, K., et al., *Central antinociceptive effects of mitragynine in mice: contribution of descending noradrenergic and serotonergic systems*. European journal of pharmacology, 1996. **317**(1): p. 75-81.
103. Kumarnsit, E., et al., *Fos-like immunoreactivity in rat dorsal raphe nuclei induced by alkaloid extract of Mitragyna speciosa*. Neuroscience letters, 2007. **416**(2): p. 128-132.
104. Farah Idayu, N., et al., *Antidepressant-like effect of mitragynine isolated from Mitragyna speciosa Korth in mice model of depression*. Phytomedicine, 2011. **18**(5): p. 402-407.
105. Apriyani, E., et al., *Effects of mitragynine from Mitragyna speciosa Korth leaves on working memory*. Journal of ethnopharmacology, 2010. **129**(3): p. 357-360.
106. Hazim, A.I., M. Mustapha, and S.M. Mansor, *The effects on motor behaviour and short-term memory tasks in mice following an acute administration of Mitragyna speciosa alkaloid extract and mitragynine*. Journal of Medicinal Plants Research, 2011. **5**: p. 5810-5817.
107. Senik, M.H., et al., *Effect of acute administration of Mitragyna speciosa Korth. standardized methanol extract in animal model of learning and memory*. Journal of Medicinal Plants Research, 2012. **6**: p. 1007-1014.
108. Senik, M., et al., *Mitragyna speciosa Korth standardized methanol extract induced short-term potentiation of CA1 subfield in rat hippocampal slices*. J. Med. Plant Res, 2012. **6**(7): p. 1234-1243.

109. Winter, C., E. Risley, and G. Nuss, *Carrageenan-induced edema in hind paw of the rat as an assay for the anti-inflammatory drugs*. Proceedings of the society for experimental Biology and Medicine, 1962. **111**: p. 544-547.
110. Utar, Z., et al., *Mitragynine inhibits the COX-2 mRNA expression and prostaglandin E2 production induced by lipopolysaccharide in RAW264. 7 macrophage cells*. Journal of ethnopharmacology, 2011. **136**(1): p. 75.
111. Azizi, J., et al., *In Vitro and in Vivo Effects of Three Different Mitragyna speciosa Korth Leaf Extracts on Phase II Drug Metabolizing Enzymes—Glutathione Transferases (GSTs)*. Molecules, 2010. **15**: p. 432-441.
112. Parthasarathy, S., et al., *Evaluation of antioxidant and antibacterial activities of aqueous, methanolic and alkaloid extracts from Mitragyna speciosa (Rubiaceae family) leaves*. Molecules, 2009. **14**(10): p. 3964-3974.
113. Kumarnsit, E., N. Keawpradub, and W. Nuankaew, *Acute and long-term effects of alkaloid extract of Mitragyna speciosa on food and water intake and body weight in rats*. Fitoterapia, 2006. **77**(5): p. 339-345.
114. Chittrakarn, S., et al., *Inhibitory effects of kratom leaf extract (Mitragyna speciosa Korth.) on the rat gastrointestinal tract*. Journal of ethnopharmacology, 2008. **116**(1): p. 173-178.
115. Purintrapiban, J., et al., *Study on glucose transport in muscle cells by extracts from Mitragyna speciosa (Korth) and mitragynine*. Natural Product Research, 2011. **25**(15): p. 1379-1387.
116. Tsuchiya, S., et al., *Effect of mitragynine, derived from Thai folk medicine, on gastric acid secretion through opioid receptor in anesthetized rats*. European journal of pharmacology, 2002. **443**(1): p. 185-188.
117. Harizal, S., et al., *Acute toxicity study of the standardized methanolic extract of Mitragyna speciosa Korth in Rodent*. Journal of ethnopharmacology, 2010. **131**(2): p. 404-409.
118. Chittrakarn, S., et al., *The neuromuscular blockade produced by pure alkaloid, mitragynine and methanol extract of kratom leaves (Mitragyna speciosa Korth.)*. Journal of ethnopharmacology, 2010. **129**(3): p. 344-349.

119. Roche, K., et al., *Kratom: a case of a legal high*. Clinical Toxicology, 2008. **46**(7): p. 598.
120. Sheleg, S.V. and G.B. Collins, *A coincidence of addiction to "Kratom" and severe primary hypothyroidism*. Journal of addiction medicine, 2011. **5**(4): p. 300-301.
121. Meites, J., et al., *Relation of endogenous opioid peptides and morphine to neuroendocrine functions*. Life sciences, 1979. **24**(15): p. 1325-1336.
122. Ogrin, C. and G. Schussler, *Suppression of thyrotropin by morphine in a severely stressed patient*. Endocrine journal, 2005. **52**(2): p. 265-269.
123. Rauhala, P., P. Männistö, and R. Tuominen, *Effect of chronic morphine treatment on thyrotropin and prolactin levels and acute hormone responses in the rat*. The Journal of pharmacology and experimental therapeutics, 1988. **246**(2): p. 649-654.
124. Nelsen, J.L., et al., *Seizure and coma following Kratom (Mitragynina speciosa Korth) exposure*. Journal of Medical Toxicology, 2010. **6**(4): p. 424-426.
125. McWhirter, L. and S. Morris, *A case report of inpatient detoxification after Kratom (Mitragyna speciosa) dependence*. European addiction research, 2010. **16**(4): p. 229-231.
126. Singh, D., C.P. Müller, and B.K. Vicknasingam, *Kratom (Mitragyna speciosa) dependence, withdrawal symptoms and craving in regular users*. Drug and alcohol dependence, 2014. **139**: p. 132-137.
127. Trakulsrichai, S., et al., *Kratom abuse in Ramathibodi Poison Center, Thailand: a five-year experience*. Journal of psychoactive drugs, 2013. **45**(5): p. 404-408.
128. Saidin, N.A. and N.J. Gooderham, *In vitro toxicology of extract of Mitragyna speciosa Korth, a malaysian phyto-pharmaceutical of abuse*. Toxicology, 2007. **240**(3): p. 166-167.
129. Saidin, N.A., et al., *Malaysian Kratom, a phyto-pharmaceutical of abuse: Studies on the mechanism of its cytotoxicity*. Toxicology, 2008. **253**(1): p. 19-20.
130. Moklas, M., et al., *A preliminary toxicity study of mitragynine, an alkaloid from Mitragyna Speciosa Korth and its effects on locomotor activity in rats*. Advances in Medical and Dental Sciences, 2008. **2**(3): p. 56-60.

131. Ghazali, A., et al., *Mutagenic and antimutagenic activities of Mitragyna speciosa Korth extract using Ames test*. J. Med. Plant. Res, 2011. **5**(8): p. 1345-1348.
132. European Medicines Agency, *Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology*. 1995.
133. Saidin, N.A., *Cytotoxicity of extract of Malaysian Mitragyna speciosa Korth and its dominant alkaloid mitragynine*, in *Biomolecular Medicine*. 2008, Faculty of Medicine, Imperial College London: London.
134. Mosmann, T., *Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays*. Journal of immunological methods, 1983. **65**(1): p. 55-63.
135. Riss, T., et al., *Cell Viability Assays*, in *Assay Guidance Manual*. 2013.
136. Borenfreund, E. and J.A. Puerner, *Toxicity determined in vitro by morphological alterations and neutral red absorption*. Toxicology letters, 1985. **24**(2): p. 119-124.
137. Griffon, G., J.-L. Merlin, and C. Marchal, *Comparison of sulforhodamine B, tetrazolium and clonogenic assays for in vitro radiosensitivity testing in human ovarian cell lines*. Anti-cancer drugs, 1995. **6**(1): p. 115-123.
138. Collins, A.R., *The comet assay for DNA damage and repair*. Molecular biotechnology, 2004. **26**(3): p. 249-261.
139. Fraga, S., et al., *Influence of the surface coating on the cytotoxicity, genotoxicity and uptake of gold nanoparticles in human HepG2 cells*. Journal of Applied Toxicology, 2013. **33**(10): p. 1111-1119.
140. Singh, N.P., et al., *A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells*. Experimental cell research, 1988. **175**(1): p. 184-191.
141. Moreira, F.X., et al., *Analytical investigation of legal high products containing Salvia divinorum traded in smartshops and internet*. Forensic science international, 2014.